

Synthese und bioanalytische Charakterisierung von neuen
halogenierten *N*-heterozyklischen Carben Gold(I)
Organometallkomplexen als potentielle Zytostatika und
Antibiotika

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Claudia Schmidt
aus Celle

1. Referent:	Professor Dr. Ingo Ott
2. Referent:	Professor Dr. Hermann Wätzig
3. Referent:	Professor Dr. Ronald Gust
eingereicht am:	23.11.2016
mündliche Prüfung (Disputation) am:	19.04.2017

Druckjahr 2017

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Schmidt, C., Karge, B., Misgeld, R., Prokop, A., Franke, R., Brönstrup, M., Ott, I. Gold(I) NHC Complexes: Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-positive directed Antibacterial Effects. *Chem. Eur. J.* (2017) 23(8), 1869 – 1880, DOI: 10.1002/chem.201604512.

Tagungsbeiträge

Schmidt, C., Ott, I. Fluorinated Gold(I) *N*-Heterocyclic Carbene Complexes As Anticancer Agents: Cytotoxicity, TrxR Inhibition, Biodistribution and Stability (Poster) 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC), Budapest 2016.

Schmidt, C., Neue halogenierte *N*-heterozyklische Carben Gold(I) Komplexe mit antiproliferativen Eigenschaften als potentielle Zytostatika (Vortrag) Pharmazieseminar SS2016, Braunschweig 2016.

Schmidt, C., Reichl, S., Ott, I. Fluorinated Gold(I) *N*-heterocyclic Carbene Complexes with Anticancer Properties – Investigation of Cytotoxicity, Enzyme Inhibition, Biodistribution and Intestine Permeability (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Düsseldorf 2015.

Schmidt, C., Misgeld, R., Prokop, A., Ott, I. Halogenated Gold(I) *N*-heterocyclic Carbene Complexes – Biodistribution, Cytotoxicity and Thioredoxin Reductase Inhibition (Poster) 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC), Galway 2015.

Schmidt, C., Sergeev, G., Franke, R., Brönstrup, M., Ott, I. Halogenated Gold(I) NHC Complexes and their Antiproliferative Effects on Tumor Cells and Bacteria (Poster) Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Frankfurt 2014.

Schmidt, C., Ott, I. Halogenated Gold(I) NHC Complexes and their Biological Evaluation (Poster) 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC), Zürich 2014.

Meinen Großeltern Frieda und Adolf gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und allgemeine Grundlagen	1
1.1	Krebs: Epidemiologie	1
1.2	Infektionskrankheiten: Probleme der antibiotischen Therapie.....	3
1.3	Metallverbindungen in der medizinischen Anwendung	6
1.3.1	Ein historischer Rückblick in die letzten Jahrhunderte	6
1.3.2	Auranofin als Leitstruktur für Goldkomplexe	9
1.3.3	Entwicklung neuer Chemotherapeutika mit Gold als Zentralion	10
1.4	<i>N</i> -heterozyklische Carbene als Liganden für Metallkomplexe.....	13
1.4.1	Entdeckung der <i>N</i> -heterozyklischen Carbene	13
1.4.2	Definition	14
1.4.3	Bindungsmechanismus von Singulett- und Triplettcarbenen	15
1.5	Goldkomplexe, ihre Targets und Wirkmechanismen.....	17
1.6	Die Thioredoxinreduktase als Target von Zytostatika und Antibiotika	25
1.6.1	Thioredoxinreduktase der Säugetiere	27
1.6.2	Bakterielle Thioredoxinreduktase	30
1.7	Modifizierungen von Arzneistoffen mit Halogenen.....	33
1.7.1	Aktuelle Entwicklungen und Halogenbindungen	33
1.7.2	Fluor in der medizinischen Chemie	36
1.7.3	Brom in der medizinischen Chemie.....	38
1.8	Quantitative Analytik von Halogenen	40

1.8.1	Methoden zur Analytik von Halogenen in biologischen Proben	40
1.8.2	Die hochauflösende Kontinuumsstrahler-Atomabsorptionsspektroskopie	40
1.8.3	Verwendete Techniken zur Quantifizierung von Brom und Fluor	43
2	Fragestellungen und Zielsetzung des Projekts	47
3	Entwicklung neuer metallorganischer Gold(I)komplexe mit NHC Liganden	52
3.1	Strukturdesign der neuen NHC Gold(I)komplexe	52
3.2	Synthesewege	55
3.3	Reaktionsverfolgung und Besonderheiten der NMR Spektren	57
3.3.1	¹ H NMR Spektroskopie	57
3.3.2	¹³ C NMR Spektroskopie	62
3.3.3	¹⁹ F NMR Spektroskopie	66
3.4	Besonderheiten bei der massenspektrometrischen Charakterisierung	67
4	Gold(I) <i>N</i>-heterozyklische Carben Komplexe als potentielle Zytostatika	69
4.1	Zytotoxizitätsbestimmung mit dem Kristallviolettassay	69
4.1.1	Phenylimidazol und (Benz)imidazoliumiodide	71
4.1.2	Mono-NHC Gold(I)komplexe	72
4.1.3	Bis-NHC Gold(I)komplexe	73
4.1.4	Goldhaltige Referenzen	74
4.1.5	Zusammenfassung	76
4.2	Bioverteilung	79
4.2.1	Etablierung einer MAS-Methode zur Quantifizierung von Fluor	79
4.2.2	Proteinbindungsstudien mit Serumalbumin und fetalem Kälberserum	86

4.2.3	Zellaufnahmestudien in MCF-7 Brustkrebszellen.....	91
4.2.4	Bestimmung der Lipophilie	100
4.2.5	Photometrische Stabilitätsuntersuchungen von mono-NHC Komplexen.....	104
4.2.6	LC-MS(ESI) Stabilitätsuntersuchungen von bis-NHC Komplexen	106
4.3	Enzyminhibition der Thioredoxinreduktase von Säugetieren	111
4.3.1	Phenylimidazol und (Benz)Imidazoliumiodide	112
4.3.2	Mono-NHC Gold(I)komplexe	113
4.3.3	Bis-NHC Gold(I)komplexe	114
4.3.4	Goldhaltige Referenzen.....	116
4.3.5	Zusammenfassung	117
4.4	Apoptoseinduktion in Nalm-6 Zellen	118
5	Gold(I) <i>N</i>-heterozyklische Carben Komplexe als potentielle Antibiotika	120
5.1	Bakterielle Wachstumshemmung im Mikroboullion-Verdünnungstest.....	120
5.2	Enzyminhibition der Thioredoxinreduktase von <i>Escherichia coli</i>	124
5.2.1	Phenylimidazol und (Benz)Imidazoliumiodide	124
5.2.2	Mono-NHC Gold(I)komplexe	125
5.2.3	Bis-NHC Gold(I)komplexe	126
5.2.4	Goldhaltige Referenzen.....	127
6	Diskussion	130
6.1	Neue NHC-Gold(I)komplexe als potenzielle Zytostatika	130
6.2	Neue NHC-Gold(I)komplexe als potenzielle Antibiotika	138
6.3	Stabilität	141

7	Zusammenfassung.....	144
8	Materialien und Methoden	145
8.1	Geräteliste.....	145
8.2	Verwendete Reagenzien	146
8.3	Allgemeine Synthesevorschriften	150
8.3.1	Synthese der Benzimidazole (a).....	151
8.3.2	Synthese der (Benz)Imidazoliumiodide (b)	151
8.3.3	Synthese der mono-NHC Gold(I)komplexe (c).....	151
8.3.4	Synthese der bis-NHC Gold(I)komplexe (d).....	152
8.4	Charakterisierung der synthetisierten Substanzen	153
8.4.1	(Benz)Imidazole.....	153
8.4.2	(Benz)Imidazoliumiodide	154
8.4.3	Mono-NHC Gold(I)komplexe	159
8.4.4	Bis-NHC Gold(I)komplexe	164
8.5	Allgemeine Zellkultur.....	168
8.5.1	Passagieren der Zellen.....	168
8.5.2	Verwendete Zelllinien in der Zellkultur.....	170
8.6	Kristallviolettassay zur Bestimmung der Zytotoxizität	172
8.7	Zellaufnahme in MCF-7 Zellen	175
8.7.1	Inkubation	175
8.7.2	Proteinbestimmung.....	176
8.7.3	Bestimmung des Gold- bzw. Halogengehalts mittels AAS/MAS.....	177

8.8	Proteinbindung an Serumalbumin und Proteine des fetalen Kälberserums	179
8.8.1	Durchführung	179
8.8.2	Messung	180
8.8.3	Berechnung	180
8.9	Bestimmung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P)	181
8.10	Quantifizierung mit HR-CS AAS/MAS.....	181
8.10.1	Gold	182
8.10.2	Fluor.....	183
8.11	Photometrische Stabilitätsuntersuchungen.....	185
8.11.1	Gerätespezifikationen und Einstellungen	185
8.11.2	Probenvorbereitung	185
8.12	HPLC-MS Stabilitätsuntersuchungen	185
8.12.1	Gerätespezifikationen	185
8.12.2	Einstellungen	186
8.12.3	Probenvorbereitung und Durchführung	186
8.13	Thioredoxinreduktase (Säugetier) Enzyminhibitionstest	186
8.14	Apoptoseinduktion in Nalm-6 Zellen: Zellzyklus-Analyse	188
8.15	Bakterielle Wachstumshemmung: Mikrobouillon-Verdünnungstest.....	189
8.16	Thioredoxinreduktase (E.coli) Enzyminhibitionstest.....	190
9	Referenzen	193

Abkürzungsverzeichnis

$(\text{CH}_3)_2\text{SAuCl}$	Chloro(dimethylsulfid)gold(I)
ABC	ATP Binding Cassette
ACN	Acetonitril
APPI	Atmospheric Pressure Photolonization (Atmosphärendruck-Photoionisation)
Äq	Äquivalent(e)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovine Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CDCl_3	deutერიertes Chloroform
CE	Capillary Electrophoresis (Kapillarelektrophorese)
CO_2	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronic Obstructive Pulmonary Disease (chronische obstruktive Lungenerkrankung)
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P
DC	Dünnschichtchromatografie
DCM	Dichlormethan
DEPT	Distorsionless Enhancement by Polarisation Transfer
DMARD	Disease Modifying Antirheumatic Drug
DMEM	Dubecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Diethylenaminoessigsäure
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrospray Ionisation
EtOH	Ethanol
F-AAS	Flamme (Atomisierungstechnik bei der AAS)
FAD	Flavinadenindinukleotid
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
GABA	Gamma-Aminobutyric Acid (γ -Aminobuttersäure)
GF-AAS	Grafitrohr (Atomisierungstechnik bei der AAS)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochdruckflüssigchromatographie)

HR-CS ASS	High resolution continuum source atomic absorption spectroscopy (Hochauflösende Kontinuumstrahler - Atomabsorptionsspektroskopie)
HSAB	Hard and Soft Acids and Bases
IC	Ionenchromatographie
IC ₅₀	halb maximale Hemmkonzentration
ICP	induktiv gekoppeltes Plasma
INN	International Non-proprietary Name (Arzneimittelstoffliste)
IARC	International Agency for Research on Cancer
ISE	Ionenselektive Elektrode (potentiometrische Quantifikation)
mamm.	mammalian (Säugetier-)
MAS	Molekülabsorptionsspektroskopie
MDR1	Multidrug Resistance Protein 1
MeOH	Methanol
MHz	Megahertz
MRP1	Multidrug Resistance Related Protein 1
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NAA	Neutronenaktivierungsanalyse
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (oxidiert)
NADPH + H ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NHC	<i>N</i> -heterozyklische Carbene
NMR	Nuclear magnetic resonance (Kernspinresonanzspektroskopie)
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drugs (nichtsteroidale Antiphlogistika)
OES	Optische Emissionsspektroskopie
p. A.	pro Analyse
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
P-gp	P-glycoprotein
ppm	parts per million
RO5	Rule of Five
RT	Raumtemperatur
THF	Tetrahydrofuran
TMS	Tetramethylsilan

TNB	5-Thionitrobenzoesäure
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid (INN: Trometamol)
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxin Reduktase
TXRF	Totalreflektion Röntgenfluoreszenz Analyse
USAN	United States Adopted Name (Arzneimittelstoffliste)
UV-VIS	Bereich des ultravioletten und sichtbaren Lichts
WDI	World Drug Index (Datenbank)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

1 Einleitung und allgemeine Grundlagen

1.1 Krebs: Epidemiologie

Die häufigsten Todesursachen in Europa und Deutschland sind laut der Weltgesundheitsorganisation WHO und des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden Herzkreislauferkrankungen (wie die chronische ischämische Herzkrankheit, akuter Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz oder Schlaganfall), Krebserkrankungen (v.a. Lungen- und Bronchialkarzinome, Mammakarzinome, Kolonkarzinome) und Erkrankungen der Atemwegsorgane (chronisch obstruktive Lungenerkrankung, Lungenentzündung, Grippe und Asthma bronchiale) (Abb. 1). [1, 2] Da sich die Lebensbedingungen und der medizinische Fortschritt in den Industrieländern stetig verbessert, steigt damit auch die Lebenserwartung der Menschen. Das durchschnittliche Sterbealter liegt in Deutschland mittlerweile bei 78 Jahren. Der Alterungsprozess ist einer der ausschlaggebendsten Risikofaktoren für verschiedene Krankheiten, womit auch das statistische Risiko an Krebs zu erkranken steigt. [2, 3] Bereits heute sind Krebserkrankungen in ungefähr der Hälfte aller europäischen Länder schon die häufigste Todesursache vor den Herzkreislauferkrankungen. Trotz des immer größer werdenden Angebots an Vorsorgeuntersuchungen und Therapien ist die Tendenz steigend. [1, 3]

In Europa werden jährlich 3,0 Millionen Neuerkrankungen registriert und 1,7 Millionen Menschen sterben an den Folgen von Krebs. [4] Die häufigsten letal verlaufenden Krebserkrankungen sind bei Frauen Brustdrüsenkarzinome, Lungen- und Bronchialkarzinome und Bauchspeicheldrüsenkrebs. Männer sterben vor allem an Lungen- und Bronchialkarzinomen, Prostatakrebs und Kolonkarzinomen. [5]

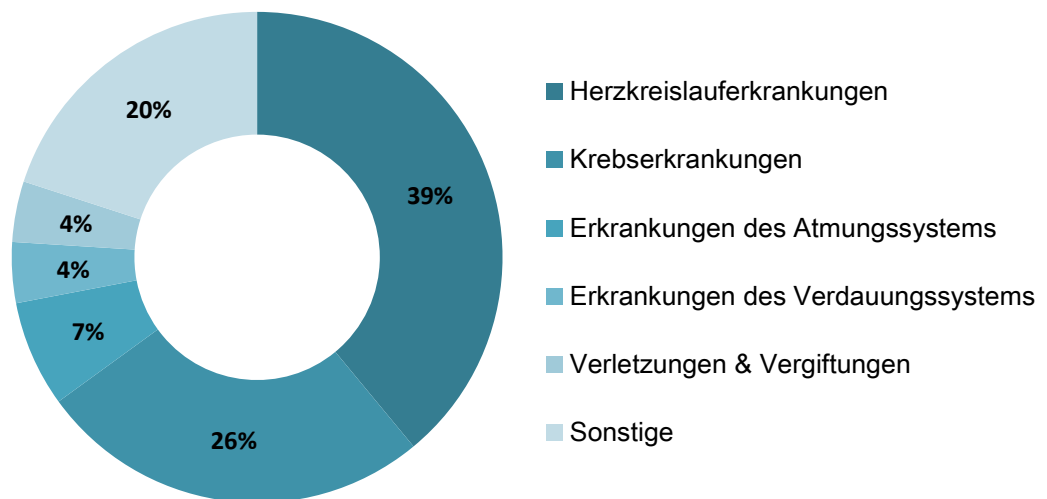


Abb. 1: Todesursachen in Deutschland nach dem Statistischen Bundesamt Wiesbaden (Stand 09/2016) [2]

Die Ursachen von Krebs sind vielfältig und zu großen Teilen auch auf Umweltbedingungen und den persönlichen Lebensstil zurückzuführen. [6] Die Internationale Agentur für Krebsforschung IARC (engl. *International Agency for Research on Cancer*) hat auf ihrer Homepage eine ständig aktualisierte Stoffliste von Substanzen aus den verschiedensten Bereichen veröffentlicht und diese nach ihrem kanzerogenen Potential in verschiedene Gefährdungsklassen eingeteilt. Die Zusammenhänge zwischen vielen dieser aufgeführten Verbindungen und bestimmten Krebserkrankungen wurde im neusten World Cancer Report der WHO dargestellt. Zusammenfassend können die wichtigsten protektiven als auch kanzerogenen Ursachen des alltäglichen Lebens der folgenden Tabelle (Tab. 1) entnommen werden. Rauchen, Alkoholkonsum, Übergewicht, Infektionen, die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung, schädlichen Substanzen am Arbeitsplatz oder in der Umwelt machen den größten Teil der beeinflussbaren Risikofaktoren aus. [6]

Die Probleme bei der derzeitigen Krebstherapie bestehen in dem häufigen Resistenzaufkommen gegen die Chemotherapeutika [7–10] und ihren starken Nebenwirkungen während der Therapie und nach der Behandlung. [3, 11]

Kanzerogene	betroffene Organe
Tabakrauch	Lunge, Oropharynx, Pankreas, Blase,
Kautabak, Betelnüsse	Mund, Rachen, Pankreas
Alkohol	Verdauungstrakt, Brust
Helicobacter pylori	Magen
HPV	Gebärmutterhals, Kopf, Nacken
HBV/HCV	Leber
HIV	verschiedene
hormonalen Kontrazeptiva	Brust, Gebärmutterhals
Übergewicht/Adipositas	verschiedene
rotes verarbeitetes Fleisch	Kolon, Rektum
Molkereiprodukte	Prostata
Röntgen- und Gammastrahlung	Blut, Haut, Schilddrüse und andere
UV-Strahlung	Haut
Luftverschmutzung durch: Asbest, Diesel, Kieselgel, Feinstaub, Tabak, Kohleverbrennung	v.a. Lunge
TCDD (Pestizid)	verschiedene
Wasserverschmutzung durch: Arsenverbindungen, Chrom(VI)verbindungen, Trichlorethylen	Lunge, Nieren, Blase, Haut
Arzneistoffe (Immunsuppressiva, Hormonpräparate, antineoplastische Medikamente)	Haut, lymphatisches System, Brust, Gebärmutter Schleimhaut, Blut

Tab. 1: Übersicht über die wichtigsten Kanzerogene des World Cancer Report 2014 [6]

Somit nimmt die Bedeutung der Entwicklung von Arzneistoffen mit neuen oder verbesserten Wirkmechanismen ständig zu, womit die bestehenden Resistenzen durchbrochen werden können und weniger Nebenwirkungen auftreten.

1.2 Infektionskrankheiten: Probleme der antibiotischen Therapie

Im Jahr 1929 entdeckte Alexander Fleming das antibiotisch wirksame Penicillin [12], für dessen Entdeckung er dann 16 Jahre später mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde [13]. In den folgenden Jahren wurde auf diesem Erfolg aufbauend eine Vielzahl von neuen Antibiotika entwickelt und in großen Mengen angewendet. Dies führte dazu, dass sich

zunehmend Einzel- als auch Multiresistenzen gegen immer mehr Antibiotikaklassen entwickelten (Tab. 2). Weltweit werden ungefähr eine Million Todesfälle auf Infektionen mit multiresistenten Keimen zurückgeführt und nach der aktuellen Prognose für die nächsten Jahrzehnte soll sich diese Zahl vervielfachen. [14]

Ein Grund für die schnelle Verbreitung der resistenten Keime ist die Zunahme der interkontinentalen Reisen über den gesamten Globus. Dadurch können die Erreger, von verschiedenen Teilen der Erde, ihre Resistenzgene untereinander austauschen und dadurch noch gefährlichere Mutanten erzeugt werden. [15–17] Ein weiteres Problem stellt die breite und unüberlegte Anwendung von Antibiotika bei harmlosen Infekten oder die präventionelle Antibiotikatherapie in Krankenhäusern dar, die einen hohen Selektionsdruck auf die Erreger ausüben. [15–17]

Vor allem vor großen operativen Eingriffen werden Antibiotika verabreicht um Infektionen zu verhindern. Hinzu kommt, dass viele Krankenhauspatienten schon immungeschwächt sind und die Übertragung der Erreger zwischen den Patienten durch mangelnde Hygiene und die räumliche Nähe oft schwer zu vermeiden ist. [17, 18]

Resistenzen können sich durch zufällige Mutationen im Genom der Erreger entwickeln, sodass sich nur die Individuen durchsetzen und überleben, die den herrschenden Umweltbedingungen am besten gewachsen sind. Bei einigen Stämmen wird die Resistenzverbreitung durch den interzellulären Austausch von DNA, Bakteriophagen, Plasmiden oder Transposons unterstützt. Resistenzgene, die auf diesen Genabschnitten liegen, können unter den Erregern ausgetauscht und verbreitet werden. [17–19]

Die dahinter stehenden Mechanismen bestehen in der Synthese von antibiotikaabbauenden und -inaktivierenden Enzymen oder einem effektiven Effluxtransport der Wirkstoffe. [18–20]

Erreger	gram	Resistenzen	Infektionen
Escherichia coli	negativ	Ampicillin, Amoxicillin (Breitbandpenicilline) Fluorquinolone Cephalosporine (3. Gen.)	Urogenitaltrakt Niere
Klebsiella pneumoniae	negativ	Cephalosporine (3. Gen.) Carbapeneme	Urinaltrakt Respirationstrakt
Staphylococcus aureus (MRSA)	positiv	Methicillin (penicillinase-stabile Penicillin)	Haut Weichteile Knochen Blutstrom
Streptococcus pneumoniae	positiv	Penicilline	Lunge (Pneumonie) Ohren (Mittelohrentzündung) Hirnhautentzündung (Meningitis)
Salmonellen	negativ	Fluorquinolone	Magen-Darm-Trakt (Gastroenteritis) Darm (Ileothypus)
Shigellen	negativ	Fluorquinolone Ciprofloxacin (Fluorquinolon) Azithromycin (Makrolidantibiotikum)	Darm (Diarrhoe)
Neisseria gonorrhoeae	negativ	Penicillin Tetracyclin Cephalosporine (3. Gen.)	Genitalien Pharynx Rektum

Tab. 2: Wichtigste Resistenzen von bakteriellen Erregern von internationalen Interesse nach dem Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014 [14]

Um diesen Problemen entgegenzuwirken sollte der Gebrauch von Antibiotika möglichst gering gehalten werden. Hygienestandards in Krankenhäusern, Pflegeheimen und dem Rettungsdienst müssen verschärft werden und die empfohlenen Schutzimpfungen sollten durchgeführt werden. [15] Die Anwendung bei Nutztieren, in der Landwirtschaft und die Ableitung ins Grundwasser durch antibakterielle Waschmittel sollte ebenfalls weiter eingeschränkt werden. Zudem ist die Entwicklung von neuen Antibiotikaklassen mit andersartigen Wirkmechanismen eine notwendige Schlussfolgerung. [18, 19]

1.3 Metallverbindungen in der medizinischen Anwendung

1.3.1 Ein historischer Rückblick in die letzten Jahrhunderte

Metallverbindungen haben sich in der Medizin schon seit vielen Jahrhunderten ihre Daseinsberechtigung geschaffen und werden auch heutzutage in immer mehr Gebieten der Medizin routinemäßig eingesetzt (Abb. 2). [21] Silbernitrat wurde schon im Mittelalter bei Magengeschwüren und Verbrennungen verwendet und war seit dem 19. Jahrhundert unter der Bezeichnung „Höllenstein“ im deutschsprachigen Raum bekannt. [22] Erste Berichte von der medizinischen Anwendung von Silber gehen noch auf das alte Rom bis auf einige Jahre vor unsere Zeitrechnung zurück. [23] Noch heute wird von der antibakteriellen Wirkung des Silbers profitiert, ob zur Wunddesinfektion in Salben oder Wundgazen, als Beschichtung von sterilisierbaren Operationsbesteck oder in der adjuvanten Therapie mit anderen Antibiotika. [24–26]

Bismuthsalze wurden schon seit Anfang des 20. Jahrhunderts bei Gastritis oder Dyspepsie verwendet. Heutzutage sind Bismuthsubsalicylat, Bismuthsubnitrat oder Bismuthsubcitrat ein fester Bestandteil der etablierten Quadruple-Therapie bei der Behandlung von *Helicobacter pylori* Infektionen, die wegen der Resistenzzunahme die bekannte Triple-Therapie immer mehr verdrängt hat und im Vergleich eine höhere Erfolgsquote aufweist. [27–29]

Salvarsan und seine Derivate sind organische Arsenkomplexe. Sie gelten als die ersten kurativ anwendbaren Antibiotika gegen die Geschlechtskrankheit Syphilis, welche durch den bakteriellen Erreger *Treponema pallidum* übertragen wird. Diese Arzneimittelgruppe wurde jedoch schon bald nach ihrer Entdeckung von den neuen Antibiotika abgelöst, nachdem Alexander Fleming das Penicillin entdeckte. [30, 31]

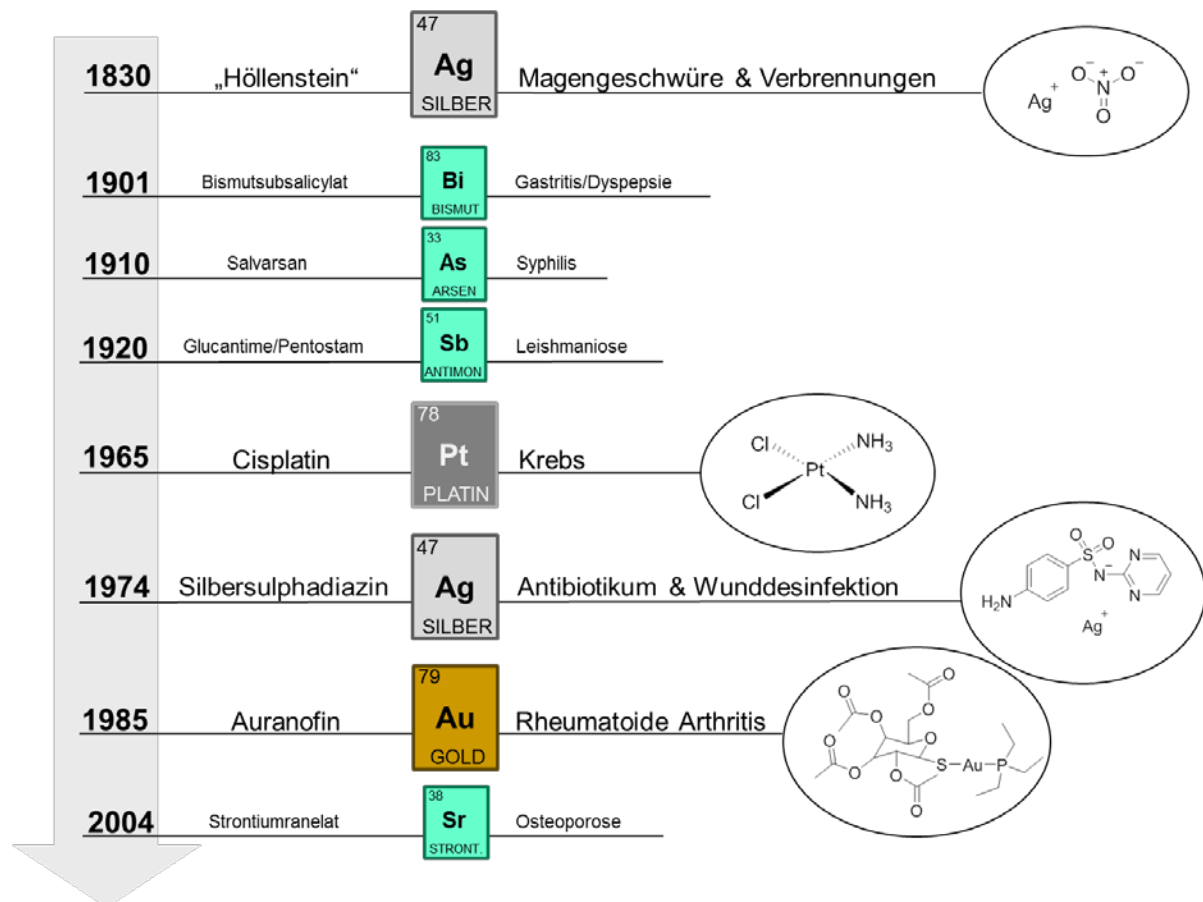


Abb. 2: Zeittafel von der Entdeckung bzw. Marktzulassung von Metallverbindungen und ihren Indikationen in der Medizin seit dem 19. Jahrhundert

Die Antimon(V)komplexe *N*-Methylglucaminantimonat und Natriumstibogluconat gehören seit Beginn der 1920er Jahre zu den First-In-Line Medikamenten bei der parasitären Erkrankung Leishmaniose. Sie gelten als Vorstufen. Die eigentliche Wirkform, in der das Metall zu Antimon(III) reduziert wurde, hemmt überlebenswichtige Enzyme der Regulierung des Redoxhaushalts der Parasiten. [32]

Cisplatin ist der bekannteste Metallkomplex in der Behandlung von Krebs seit seiner Entdeckung durch Rosenberg 1965 und wird bis heute in vielen Kombinationstherapien eingesetzt. [33] Es wurden seit seiner Entdeckung bereits mehrere Derivate auf den Markt gebracht, welche eine höhere Selektivität, weniger starke Nebenwirkungen aufweisen (Carboplatin) oder eine höhere zytotoxische Aktivität besitzen (Oxaliplatin). [34] Cisplatin gilt

als Leitstruktur für viele neue metallhaltige Zytostatika [35], von denen es neben weiteren Platinkomplexen [36, 37] auch einige Ruthenium- [36, 38], Gallium- [39, 40], Arsen- [41] Titan- [42, 43] und Palladiumkomplexe [44, 45] in die klinischen Studien geschafft haben (Abb. 3).

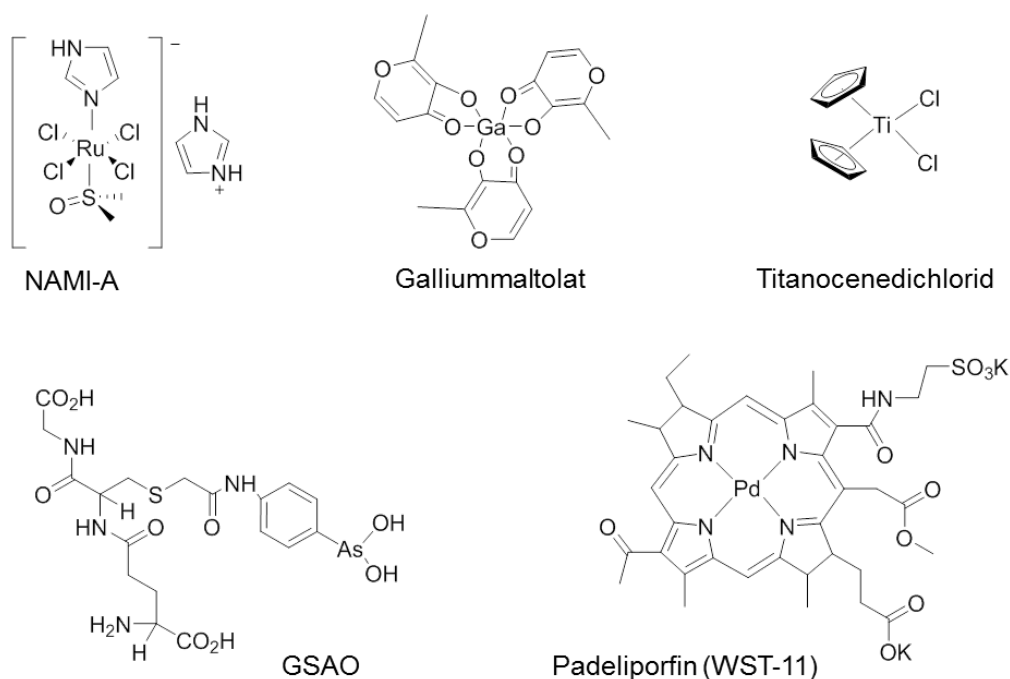


Abb. 3: Metallverbindungen in der klinischen Testung

Im Mittelalter wurden schon verschiedene Goldtränke eingesetzt, welche teils neben weiteren Metallen in Königswasser gelöstes Gold enthielten und beispielsweise bei Syphilis, Malaria, und Magengeschwüren eingesetzt worden sind. [46] Im 20. Jahrhundert folgten dann mehrere intramuskulär applizierbare Gold(I)komplexe zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis, bis im Jahr 1985 Auranofin, als erstes orales Antirheumatikum zugelassen wurde. Den Goldkomplexen wurden bereits eine antiparasitäre Wirkung gegen *Plasmodium falciparum* [47], antibakterielle Wirkungen gegen verschiedene Bakterienstämme [48–50] und antiproliferative Wirkungen auf verschiedene humane Tumorzellen [51, 52] nachgewiesen.

Das Strontiumranelat ist eine der aktuellsten Einführungen von Metallwirkstoffen in der Medizin. Das Strontiumsalz wird bei Osteoporose eingesetzt, da es bezüglich des Knochenumbaus neben seiner anabolen Wirkung zusätzlich eine antikatabole Wirkung besitzt. [53]

1.3.2 Auranofin als Leitstruktur für Goldkomplexe

Auranofin ist ein linearer Gold(I)komplex mit einem Triethylphosphan- und einem 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio- β -D-pyranosato-Liganden (Abb. 4). Die Goldverbindung wird als oral applizierbarer Arzneistoff in der Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Auranofin hat eine Plasmahalbwertszeit von 15 – 25 Tagen. Nach 55 – 80 Tagen ist der Wirkstoff vollständig eliminiert. [54] Der Komplex ist nicht wasserlöslich und wird nur in geringen Mengen absorbiert. Auranofin unterliegt aber aufgrund der hohen Affinität von Gold zu Schwefel und Selen Ligandenaustauschreaktionen mit Cysteinen und Histidinen von Proteinen. [55] Der Transport in die Zellen soll ebenfalls unter Austausch des Thiopyranoseliganden gegen Sulfhydrylgruppen von Membranproteinen stattfinden, sodass der Molekülrest bis ins Zellinnere über verschiedene schwefelhaltige Gruppen weitergegeben wird und schließlich ins Cytosol gelangt. [56]

Bei Versuchen zur intestinalen Aufnahme wurde das Auranofin nur in seiner deacetylierten Form nach seiner Aufnahme durch das Darmepithel gefunden, ohne dass zuvor Ligandenabspaltungen stattgefunden haben. [57] Die hohe Bindung an Serumalbumin im Blutkreislauf inaktiviert einen Großteil des Auranofin. [58]

Unter oxidativer Abspaltung des Phosphanrests können ebenfalls Goldbrücken zwischen zwei Strukturen ausgebildet werden. Der genaue Wirkmechanismus des Arzneistoffs ist bis jetzt nicht vollständig geklärt. [59] Die immunsuppressive Wirkung wird vor allem der Hemmung der Monozytenaktivierung als auch der T-Zellproliferation zugeschrieben. [55]

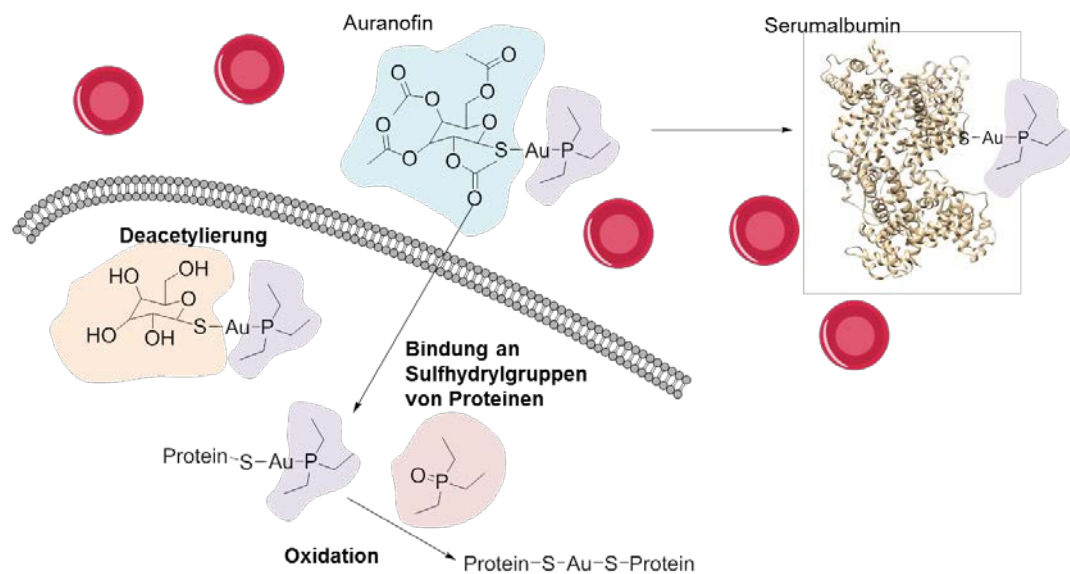


Abb. 4: Metabolismus und Zellaufnahme von Auranofin

Dadurch wird auch der Einsatz bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson oder Alzheimer diskutiert, da Auranofin die Blut-Hirn-Schranke durchqueren kann. [59] Als weitere Zielstrukturen gelten im Allgemeinen sulfhydrylhaltige Proteine, wie die Metallothioneine [60], Na⁺-K⁺-ATPase [61] oder die Thioredoxinreduktase. Der Eingriff in die Redoxbalance der Zellen und die dadurch ausgelöste Apoptose in Tumorzellen, bietet einen weiteren Einsatz in der Therapie von Krebs und erklärt die vielfach beobachteten antiproliferativen Effekte. [62] Bekannte Nebenwirkungen bei der Therapie mit dem Goldkomplex sind Diarrhoe, Aphten, Hautausschlag und Juckreiz. [63]

1.3.3 Entwicklung neuer Chemotherapeutika mit Gold als Zentralion

In der Krebstherapie gelten der Platinkomplex Cisplatin (Abb. 5) und seine Derivate als die meist eingesetzten Zytostatika bei einer Vielzahl von verschiedenen Tumorerkrankungen. [64–69] Die Nachteile des anorganischen Platinkomplexes sind die starken Nebenwirkungen wie Nephrotoxizität, Übelkeit und Neurotoxizität. Die Nebenwirkungen können sich ebenfalls

in einer Reihe von peripheren Neuropathien ausdrücken, wie Tinnitus oder Hörverlust. [67, 69]

Silber ist dagegen schon seit dem Mittelalter für seine antibiotische Wirkung bekannt. So wird heute kolloidales Silber zur äußerlichen und innerlichen Anwendung eingesetzt, um die Wirkung von anderen Antibiotika zu unterstützen. Ein weiteres Einsatzgebiet ist die Anwendung bei operativen Eingriffen an offenen Wunden, um postoperative Infektionen zu verhindern. [70–74] In den letzten Jahrzehnten wurden zudem viele Silberorganometallkomplexe hinsichtlich ihres antibakteriellen Potentials untersucht, da sie das Silberkation, welches als die aktive Wirkform angesehen wird, stabilisieren und die Reduktion zu elementarem Silber oder die Präzipitation mit Chlorid unter physiologischen Bedingungen verhindern. [26, 75–77] Das antibakterielle Potential konnte unter anderem für Komplexe mit Diphosphanen [78], pyridinüberbrückten Imidazolen [79, 80], Xanthinen [80] oder *N*-heterozyklischen Carbenen (NHCs) [81–86] als Liganden bestätigt werden.

Große Probleme in der antineoplastischen, als auch in der antimikrobiellen Chemotherapie stellen die teils starken Nebenwirkungen der bereits etablierten Arzneistoffe und das bereits angesprochene Auftreten von Resistenzen dar. [74] Diese werden zu einem Großteil auf membranständige Transportproteine wie dem P-glycoprotein (P-gp) und dem multidrug resistance-associated protein (MRP) zurückgeführt. [19, 87–89] Hierbei handelt es sich um ATP-abhängige Effluxtransporter für Xenobiotika. [90] Daher wird heute verstärkt nach neuen Arzneistoffgruppen gesucht, um Alternativen zu entwickeln und so die Resistenzbildungen zu umgehen.

Der Goldkomplex Auranofin ist aus der Therapie der rheumatoiden Arthritis bekannt. [91] Für diesen Arzneistoff wurden bereits antiproliferative Eigenschaften gegenüber Bakterien und Tumorzellen festgestellt. [92–94]

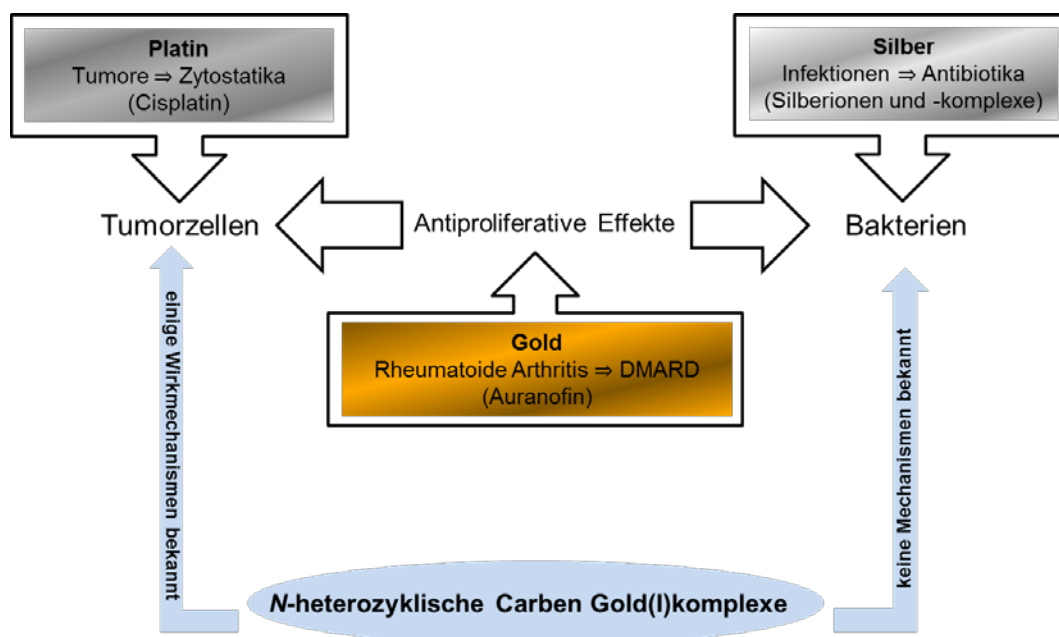


Abb. 5: Darstellung von verschiedenen metallhaltigen Arzneistoffen mit ihren etablierten therapeutischen Einsatzgebieten

Dadurch gelangten Goldkomplexe in der Krebsforschung in den Fokus der Aufmerksamkeit. Es wurde eine große Bandbreite von verschiedenen neuen Verbindungen mit Gold in den Oxidationsstufen +I und +III koordiniert mit einer Vielzahl von verschiedenen Ligandentypen synthetisiert und untersucht. Dadurch konnten erste Wirkmechanismen aufgeklärt werden. Auf dem Gebiet der Antibiotikaforschung sind die Goldkomplexe allerdings noch wenig erforscht und ihre Wirkmechanismen größtenteils unbekannt. Von der antibakteriellen Wirkung von Goldkomplexen mit Thiolaten [95], Phosphanen [95, 96] oder NHCs [86, 97–101] wurde bereits mehrfach berichtet. Eine interessante Klasse von Goldkomplexen für die Entwicklung von neuen Chemotherapeutika stellen aufgrund ihrer hohen Stabilität die *N*-heterozyklischen Carbenkomplexe dar.

1.4 *N*-heterozyklische Carbene als Liganden für Metallkomplexe

1.4.1 Entdeckung der *N*-heterozyklischen Carbene

Die Entdeckung der *N*-heterozyklischen Carbene begann mit Wanzlick Anfang der 1960er Jahre. Er spaltete durch Erwärmung aus 1,3-Diphenyl-2-trichlormethyl-imidazolidin Chloroform ab und konnte ein Produkt nachweisen, welches die doppelte molare Masse der eigentlich zu erwartenden Verbindung aufwies. [102, 103] Er beschrieb kurz darauf die Beobachtung einer temperaturabhängigen Gleichgewichtsreaktion von dem ungesättigten Carben und seinem Dimer, bekannt als Wanzlick Equilibrium [104, 105], konnte es aber nicht ausreichend belegen (Abb. 6).

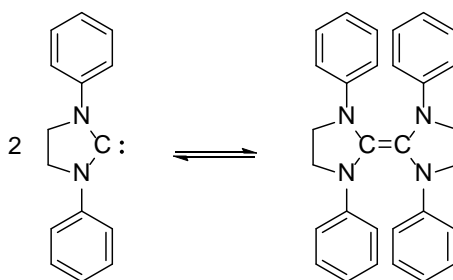


Abb. 6: Wanzlick Equilibrium eines nicht aromatischen Imidazolin-Carbens [104]

Erfolgreiche Crossover Reaktionen von Denk et al. [106] unterstrichen 1999 seine These, nachdem die gleichen Experimente unter anderen Bedingungen von Lemal et al. kurz vorher noch ohne Erfolg verliefen [107]. Weitere Untersuchungen lieferten die ersten NHC-Metallkomplexe [108, 109] mit Quecksilber. [110]

Die erste Isolierung eines stabilen *N*-heterozyklischen Carbens (Abb. 7) gelang Arduengo et al. 1991. [111] Damit ebnete er den Weg für eine große Fülle an neuen Strukturen, die ihre Anwendung in der Katalyse (Cross-Coupling Reaktion [112], Heck Reaktion [113] oder Olefin Metathese [114, 115]), als auch in der Testung in biologischen Systemen fanden. [116–124]

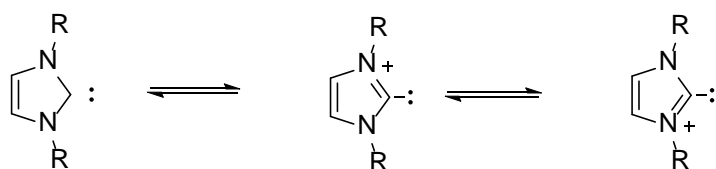


Abb. 7: Mesomere Grenzstrukturen der ungebundenen *N*-heterozyklischen Carbene

R = verschiedene Reste (elektronenschiebende Reste an den Stickstoffen und elektronenziehende Reste an den Kohlenstoffen des Aromaten erhöhen die Stabilität des Carbens)

1.4.2 Definition

Carbene sind neutrale Strukturen mit einem zweibindigen Kohlenstoff, welcher ein ungebundenes Elektronenpaar besitzt und somit ein Elektronensextett aufweist. Die beiden Elektronen können auf zwei bindende Orbitale verteilt sein (Triplettzustand) oder sich in demselben Orbital aufhalten (Singulettzustand) (Abb. 8). [125, 126]



Abb. 8: Carbene im Triplettzustand (links) und Singulettzustand (rechts), R = Reste

Carbene im Triplettzustand, besitzen keine Nachbaratome mit positivem mesomeren Effekt. Sie sind selbst elektrophil und aufgrund der diradikalischen Elektronenverteilung hoch reaktiv und schwer zu isolieren, dabei weisen sie eine lineare Geometrie auf. [126, 127]

Singulettcarbene sind durch Heteroatome oder Halogene in ihrer direkten Nachbarschaft charakterisiert. Diese üben einen positiven mesomeren Effekt aus und sind damit gute π -Elektronendonatoren. Gleichzeitig zeigen sie unterschiedlich starke negative induktive Effekte. Dies spiegelt sich in ihrer Eigenschaft als gute σ -Elektronenakzeptoren wieder. Somit stabilisieren sie zum einen das freie Elektronenpaar des Kohlenstoffs und zum anderen sein freies p-Orbital. [125–127]

Carbene mit Halogenen und/oder Sauerstoff in α -Position sind nicht stabil und dimerisieren spontan. Verbindungen mit Stickstoff, Phosphor und Schwefel in verschiedenen Kombinationen sind dagegen stabil und dimerisieren nur teilweise in Anwesenheit von Brønstedsäuren. Carbenkohlenstoffe mit zwei α -Stickstoffen sind als einzige dieser Spezies isolierbar. Sie werden auch *N*-heterozyklische Carbene genannt (NHCs). [127, 128] Da NHCs die stärksten bekannten neutralen Lewisbasen sind, eignen sie sich gut für die Komplexierung mit Übergangsmetallen, welche als Lewissäuren fungieren. [127] Sie können beispielsweise aus Imidazol-, Benzimidazol-, Triazol-, Tetrazol- oder Pyrazoliumgrundkörpern hergestellt werden. [127] Durch ihre gewinkelte Geometrie (fast sp^2 hybridisiert) bilden sie stabilere Metallbindungen als die Triplettcarbene mit ihrer linearen Struktur (sp -Hybridisierung) aus. Da NHCs stärkere σ -Donoreigenschaften besitzen als die bisher vielfach eingesetzten Phosphane, bilden sie zudem stabilere Metallkomplexe. [126, 127, 129]

1.4.3 Bindungsmechanismus von Singulett- und Triplettcarbenen

Singulett-Carbene werden auch als Fischer-Carbene bezeichnet und reagieren bevorzugt mit Übergangsmetallen niedriger Oxidationsstufen.

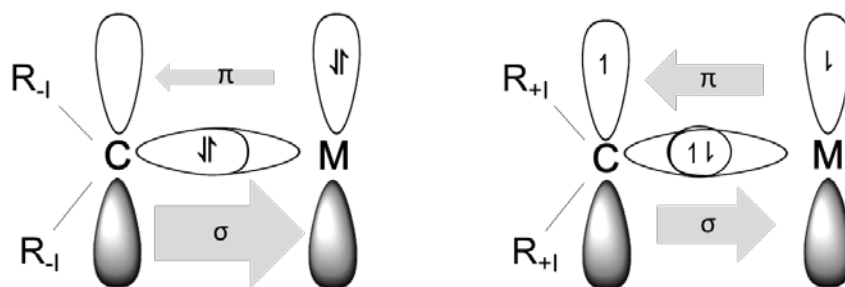


Abb. 9: Kohlenstoff-Metall-Bindungen in Fischer-Carbenen (links) und Schrock-Carbenen (rechts)

M = Metall, R = Rest mit negativen induktiven Effekt ($-I$) oder positiven induktiven Effekt ($+I$)

Die Bindung erfolgt über eine starke σ -Bindung vom Kohlenstoff ausgehend und einer sehr schwachen π -Rückbindung vom Metall. Sie wird charakterisiert durch einen leichten Doppelbindungscharakter (Abb. 9). Die Carben-Metall-Bindung selbst ist durch die elektronenziehenden Reste elektrophil. [126] Die mesomeren Grenzstrukturen eines linearen Metall-NHC-Komplexes sind im Folgenden dargestellt (Abb. 10).

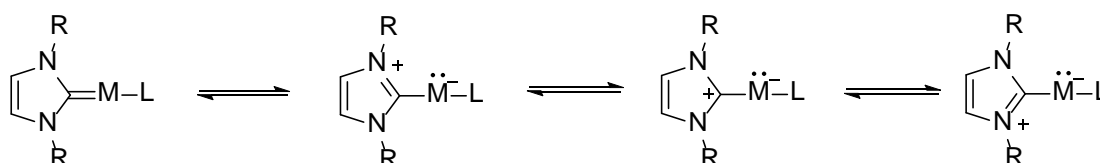


Abb. 10: Mesomere Grenzstrukturen von linearen NHC-Metallkomplexen

R = verschiedene Reste, M = Metall, L = Liganden, wie z.B. NHCs, Thiolate, Phosphane, Alkine oder Halogene

Erste Berichte über die erfolgreiche Synthese von bis-NHC Gold(I)- und Gold(III)komplexen gab es erstmals im Jahre 1973 von Parks und Balch (Abb. 11) als auch von Minghetti und Bonati. [130–132]

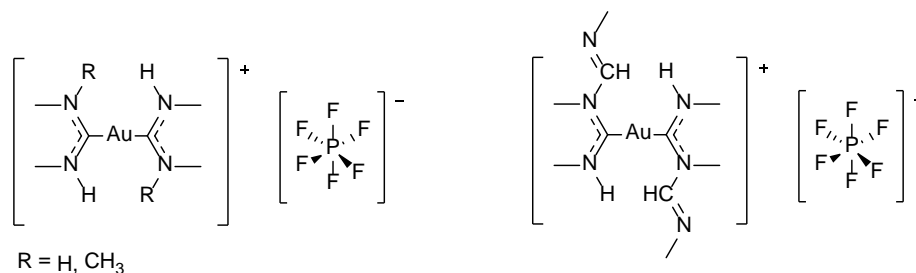


Abb. 11: Erste bis-NHC Gold(I)komplexe von Parks und Balch [131]

Triplett-Carbene werden auch Schrock-Carbene genannt und weisen durch die elektronenschiebenden Reste in Nachbarposition zum Kohlenstoff ein nukleophiles Zentrum an der Carben-Metall-Bindung auf. Neben einer starken σ -Bindung vom Kohlenstoff zum Metall tritt auch eine starke π -Rückbindung auf, daher wird hier oft von einer Doppelbindung gesprochen. Sie reagieren vor allen mit Übergangsmetallen höherer Oxidationsstufe (Abb. 9). [125, 126, 133]

1.5 Goldkomplexe, ihre Targets und Wirkmechanismen

Stabile Goldkomplexe bildet Gold in den Oxidationsstufen I und III aus. Gold(I)komplexe weisen selten einen trigonalen Aufbau oder eine tetraedrische Geometrie auf und zeigen in den meisten Fällen eine lineare Geometrie mit einer zweifachen koordinativen Bindung. Damit entspricht das Gold(I) einer d^{10} -Elektronenkonfiguration und ist isoelektronisch mit Silber(I) (Abb. 12). Gold(III)komplexe treten dagegen meist in einer quadratisch planaren Geometrie auf, wie sie auch bei Platin(II)komplexen zu finden ist. [55, 134, 135]

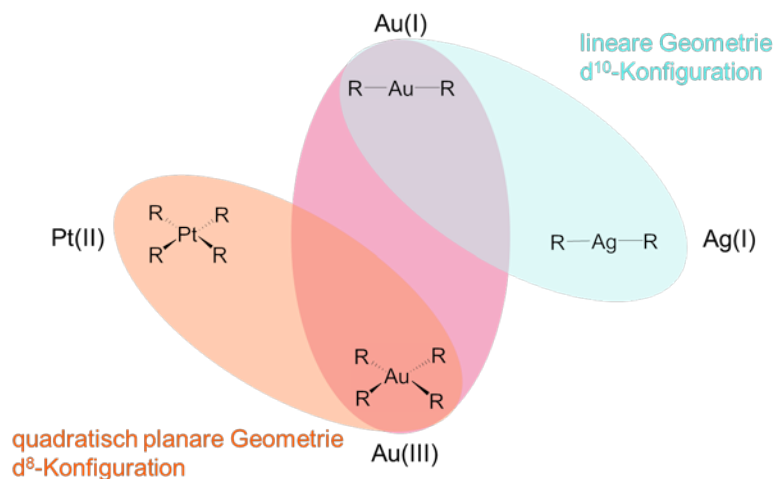


Abb. 12: Darstellung der Geometrieverwandtschaften von Platin-, Silber- und Goldkomplexen

Platin(II)komplexe sind dafür bekannt, dass sie an die DNA binden und Intrastrand-Crosslinks ausbilden. Da Gold(III)-, genau wie Platin(II)komplexe, eine d^8 -Elektronenkonfiguration besitzen, wurde anfangs vermutet, dass auch Gold(III)verbindungen einen ähnlichen Wirkmechanismus besitzen könnten. Allerdings wurde für Gold(III)bipyridylkomplexe, mehrzählige Polyamin- und oxo-Gold(III)komplexe festgestellt, dass die DNA-Schädigung reversibel und die Interaktion nur sehr schwach ausgeprägt ist. Auranofin bindet dagegen nicht an die DNA. [136] Dies ließ darauf schließen, dass die DNA nicht das hauptsächliche Target der Goldkomplexe darstellt. [137]

Die Aktivität der verschiedenen Goldkomplexe hängt stark von der Oxidationsstufe, als auch von der Stabilität der Liganden ab. Gold(I)komplexe sind aufgrund ihrer d^{10} -Konfiguration thermodynamisch stabiler im Vergleich zu Gold(III)komplexen. [120, 134] Unter physiologischen Bedingungen wird Gold(III) schnell zu Gold(I) oder elementarem Gold reduziert, wenn das Metall durch seine Liganden nicht ausreichend stabilisiert werden kann (Abb. 13). Freie Gold(I)ionen unterliegen im wässrigen Medium ebenfalls einer Disproportionierungsreaktion, bei der Gold(III) und elementares Gold entsteht. [138] Für Gold(III)komplexe ist bekannt, dass sie nach ihrer Reduzierung und Ligandenabspaltung als aktive Gold(I)komplexe in Erscheinung treten. [120] Es wurde festgestellt, dass die Reduzierung durch zelluläre Thiole, wie dem Glutathion (GSH), oder auch Ascorbinsäure ausgelöst wird (Abb. 13 unten). [120]

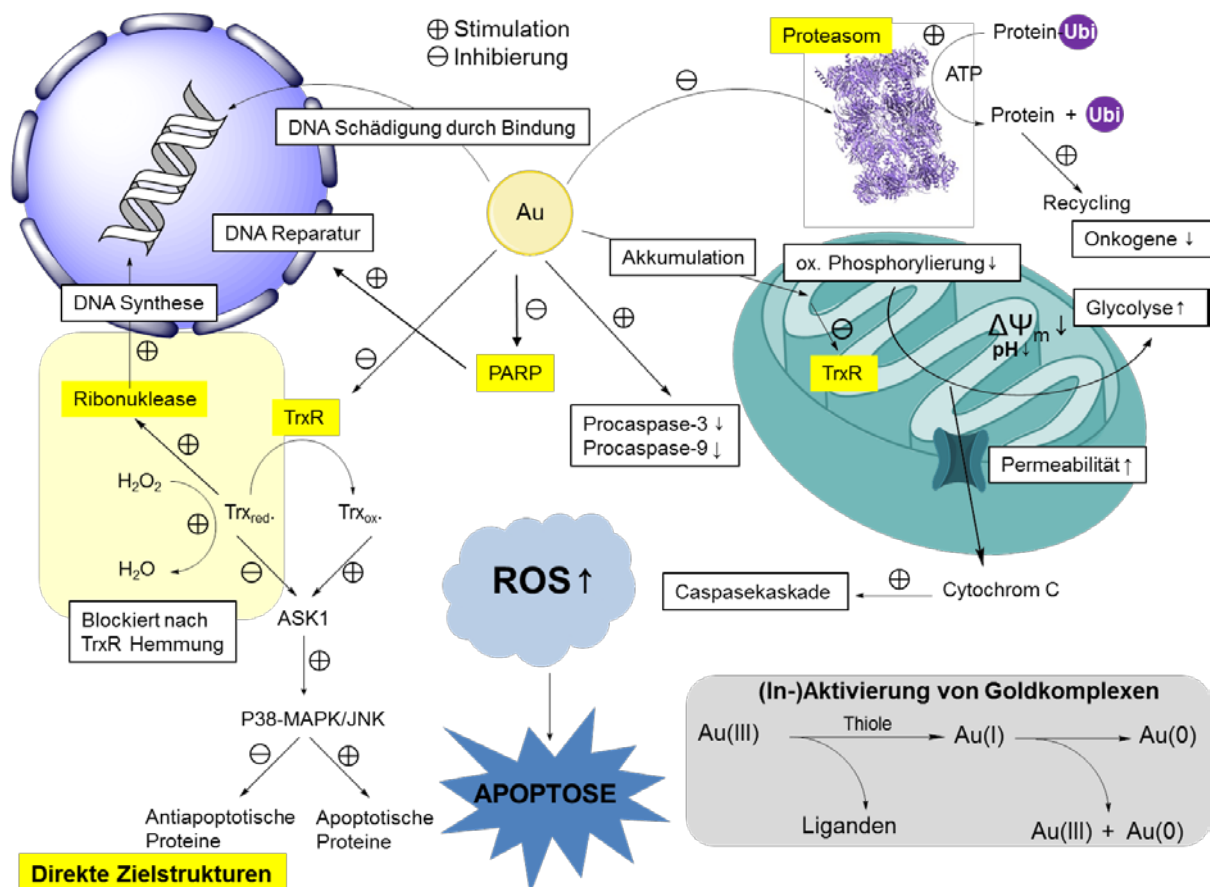


Abb. 13: Übersicht der Dissoziierungsreaktionen und den wichtigsten Targets von Goldkomplexen
(Proteasom PBD code: 5LE5), Ubi = Ubiquitin

Die große Zahl an potenziellen Proteinstrukturen stellt einen weiteren Ansatzpunkt in der Aufklärung des Wirkmechanismus dar. Aufgrund des HSAB Prinzips bieten sich vor allem für Gold(I) selenol- oder thiolhaltige Zielstrukturen an. [134, 139] Weiterführend werden einige der bekanntesten Interaktionen und Zielstrukturen für Goldkomplexe besprochen. Dazu gehören die Bindung an Serumalbumin, die Hemmung des multikatalytischen Proteasoms und der Zinkfinger-Proteine. Die Hemmung von antioxidativ wirksamen Enzymen wie der Thioredoxinreduktase (TrxR), eines der bekanntesten Targets von Goldkomplexen, wird in den inhaltlichen Bezug eingeordnet, aber tiefergehend in Kapitel 1.6 besprochen.

Die Bindung an das Transportprotein Serumalbumin konnte für Gold(I)komplexe, wie Auranofin und Chlorido(triethylphosphan)gold(I) [140, 141], als auch für mehrzählige Gold(III)komplexe [142] beobachtet werden. Während die Gold(I)komplexe über eine Ligandenaustauschreaktion direkt eine kovalente Bindung zu den Thiolen (Cystein) des Albumins ausbilden, werden die Gold(III)komplexe, wie bereits beschrieben, vorher zu Gold(I) reduziert und binden dann in dieser Oxidationsstufe an die Zielstrukturen (Abb. 13 und 14). Die Bindung an Serumalbumin im Zellkulturmedium korreliert mit einer verringerten Zellaufnahme und Zytotoxizität bei verschiedenen Gold(I)komplexen. [143, 144] Neuere Gold(III)porphyrinkomplexe sind durch ihre Liganden so stark stabilisiert, dass sie in wässrigen Medien gegenüber intrazellulärem GSH stabil bleiben. [145]

Es ist ebenfalls bekannt, dass Dithiocarbamatkomplexe mit Gold(III) als auch Gold(I) das Proteasom hemmen. [146] Bei Eukaryoten kommt der Proteinkomplex im Cytosol als auch im Nukleus der Zelle vor. Er spaltet ATP-abhängig die fehlerhaft gefalteten oder nicht verwendeten Proteine in kleinere Peptide (Abb. 13, oben). [147] Der selektive Prozess ist nicht nur ATP-, sondern auch ubiquitinabhängig. Zur Erkennung der abzubauenen Proteine werden diese zuerst mit Ubiquitin konjugiert. Dieses Konjugat wird dann von dem Proteasom erkannt und gespalten, um die Peptide und Aminosäuren zu recyceln. [148] Das Ubiquitin-

Proteasomsystem ist in der Steuerung des Zellzyklus involviert und somit am Zellwachstum, der Zellteilung und an dem Abbau von regulatorischen Enzymen und der Apoptose beteiligt (Abb. 13). [149] Die Stabilisierung oder die herabgesetzte Fragmentierung von Onkogenen ist in diesem Zusammenhang ein interessanter Ansatzpunkt bei der Therapie von Krebs. [150] Die Gold(III)komplexe sind im Vergleich zu den Gold(I)komplexen potentere Proteasominhibitoren. Im Fall der Gold(III)komplexe konnte neben einer steigenden Konzentration von ubiquitierten Proteinen auch eine höhere Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) beobachtet werden, die mit den IC_{50} Werten des Zytotoxizitätsassays korreliert. Als Wirkmechanismus wird hier ein Zusammenspiel aus der Induzierung von ROS-Anstieg und der Hemmung des Proteasom postuliert. [146]

Eine weitere zelluläre Zielstruktur in der Behandlung von Krebs stellen die Zinkfinger-Proteine dar. Hierbei handelt es sich um Proteindomänen, welche die Aminosäuren Cystein und Histidin enthalten. Vier Aminosäuren unterschiedlicher Kombination sind räumlich so angeordnet, sodass sie zusammen ionisches Zink komplexometrisch binden können. Dieses Motiv ist in vielen verschiedenen Proteinen zu finden, die besonders gut an die DNA binden. [151] Zinkfinger-Proteine sind in vielen verschiedenen Zellfunktionen involviert, unter anderem in der DNA-Synthese, -Reparatur und Apoptose. Eine Gruppe von Zinkfingerproteinen, welche eine große Rolle in der DNA-Reparatur spielen sind die Polyadenosindiphosphat-ribosepolymerasen (PARP) (Abb. 14). PARP hemmen ebenfalls die nukleäre Endonukleaseaktivität und damit die Spaltung der DNA in seine nukleosomalen Fragmente. [152] Gold(III)- und Gold(I)komplexe mit Phosphan- oder Bipyridylliganden hemmen PARP-1 durch Verdrängung des Zinks und der Bildung von sogenannten „Goldfingern“. [135, 153] Damit kann PARP nicht mehr die DNA-Reparatur bewerkstelligen und die DNA-spaltenden Endonukleasen hemmen, was wiederum die Aktivierung des proapoptotischen Moleküls p53 zur Folge hat (Abb. 14). [154] Die Spaltung von PARP und

die damit verbundene Reduktion des Apoptoseregulatorproteins Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) über p53 konnte ebenfalls von Holenya et al. bei Gold(I)komplexen beobachtet werden (Abb. 13). [155]

Für Goldkomplexe werden zwei unterschiedliche Mechanismen diskutiert. Eine Interaktionsart besteht in einem einfachen oder auch zweifachen Ligandenaustausch, wodurch kovalente Bindungen mit den Zielstrukturen eingegangen werden und es zu Überbrückungen zwischen zwei Thiolen kommen kann. [135] Eine weitere Möglichkeit zeigt, dass ein stabiler Komplex über nichtkovalente Bindungen wechselwirken kann oder in Zellorganellen akkumuliert. Dieses Phänomen wurde besonders bei den „delocalized lipophilic cations“ (DLCs) beobachtet. In vielen Tumorzellen herrscht in den Mitochondrien ein vertieftes negatives Membranpotential. Dies wird als treibende Kraft für die Akkumulation von positiv geladenen, lipophilen, membrangängigen Verbindungen beschrieben (Abb. 11 unten). [156]

Holenya et al. [155] konnten detaillierte Informationen über die Auswirkung von NHC-Gold(I)phosphankomplexen auf den Mitochondrienstoffwechsel in Tumorzellen feststellen. Die Gold(I)komplexe hemmen direkt die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette und steigern die Membranpermeabilität mit vermehrter Abgabe von Cytochrom C in das Cytosol (Abb. 14), wodurch der intrinsische Reaktionsverlauf der Apoptose induziert wird. Cytochrom C bildet mit Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) und der Procaspase-9 im Cytoplasma einen Proteinkomplex, welcher als Apoptosom bezeichnet wird und die Spaltung der Procaspase-9 zur Caspase-9 bewirkt. Dadurch wird über die Aktivierung der Procaspase-3 die Kaskade der Apoptose in Gang gesetzt, in der auch PARP involviert ist (Abb. 14). [154] Der Abbau von Procaspase-3 und -9 [155] und die Induzierung von

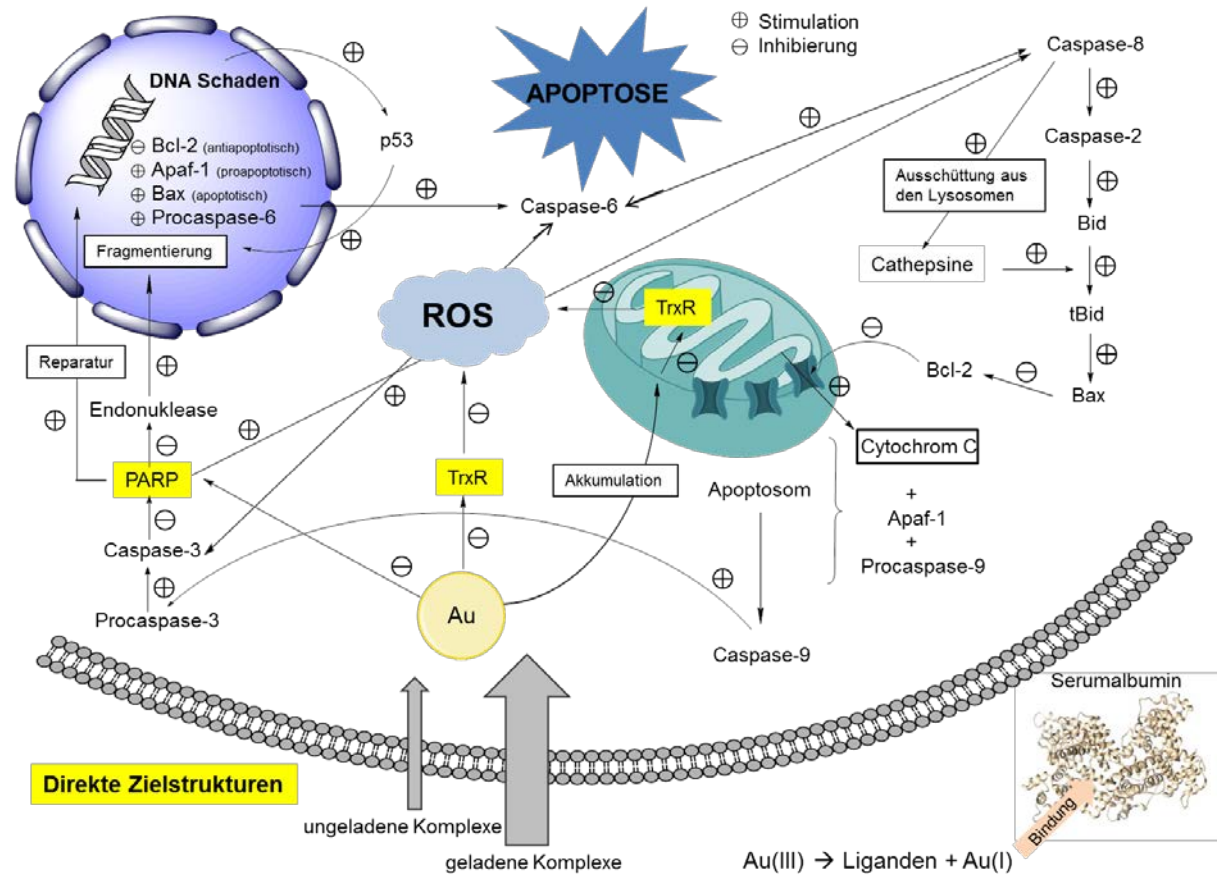


Abb. 14: Zelluläre Zielstrukturen von Goldkomplexen mit Schwerpunkt auf dem Caspasesystem (HSA PDB code: 4K2C) auf der Grundlage der Caspasekaskade von Höffeler [154]

Des Weiteren konnte für die Gold(I)komplexe die Hemmung der TrxR bestätigt werden. Dies führt im weiteren Verlauf zur Aktivierung von ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) und damit zur Induzierung der MAPK (mitogen activated protein kinases) p53 und JNK, welche ebenfalls proapoptotisch wirksam sind (Abb. 13, unten). [155, 158]

Ein weiterer Faktor für die Auslösung der Apoptose ist die Hemmung der Ribonuklease, welche in der DNA-Synthese eine wichtige Rolle spielt. Dieses Enzym wird nach der Reduzierung und Ligandenabspaltung von Gold(III)bipyridylkomplexen über eine kovalente Bindung an Histidine im katalytischen Zentrum inaktiviert (Abb. 13). [159, 160]

Der Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ist auf die Blockierung des antioxidativen Thioredoxinsystems im Cytosol, als auch in den Mitochondrien zurückzuführen (Abb. 14, hellblau). Der simultane Effekt von den beschriebenen Vorgängen führt letztendlich zum Untergang der Tumorzellen.

Weiterhin wurde beobachtet, dass Gold(III)porphyrine [161], Gold(I)NHCs [158] und Gold(III)dithiocarbamate [162] den Zellzyklus in unterschiedlichen Phasen der Zellteilung hemmen.

Die Wirkmechanismen für Goldkomplexe in der antibakteriellen Therapie sind noch weitestgehend unbekannt. Viele bekannte Mechanismen aus der Krebsforschung können jedoch auch auf die Bakterien übertragen werden.

Der Zusammenhang zwischen einer direkten Hemmung von Selenoproteinen, der Beeinflussung der Selenoproteinbiosynthese und den zelltoxischen Effekten bei verschiedenen Erregern wird aktuell diskutiert. Es wurde beobachtet, dass Auranofin die Selenaufnahme aus dem Kulturmedium in die Zellen durch Adduktbildung mit dem Substrat Hydrogenselenid hemmt. Eine konzentrationsabhängige Hemmung der Synthese von Selenoproteinen und die antiproliferative Wirkung von Auranofin auf *Clostridium difficile* und *Escherichia coli* konnte ebenfalls festgestellt werden. [50]

Samanta et al. [100] postulieren eine direkte Interaktion von NHC-Gold(I)komplexen mit der Zellmembran. Morphologische Änderungen in *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* nach der Behandlung mit Gold- und Silber-NHC-Komplexen und weiterführende Docking Studien lassen darauf schließen, dass die Lipiddoppelschicht durch Interkalation destabilisiert wird und die strukturelle Integrität durch die Einlagerung der Komplexe verloren geht. Die größere Aktivität der Goldkomplexe im Vergleich zu den Silberkomplexen wird auf die höhere Stabilität der Metall-Liganden-Bindung zurückgeführt. Dagegen sind die mono-NHC Komplexe jeweils um ein Vielfaches aktiver als die

entsprechenden bis-NHC Komplexe, welche allgemein als stabiler gelten. Die getesteten Stämme zeigten Resistenzen gegen herkömmliche Antibiotika. Die wachstumshemmende Wirkung der Metallkomplexe im Vergleich zu den verwendeten Referenzantibiotika lässt auf einen unterschiedlichen Wirkmechanismus schließen und liefert einen Ansatzpunkt für die weiterführende Entwicklung von Goldkomplexen in diesem Gebiet. [100]

Da sich das Thioredoxinsystem über die Jahre als ein etabliertes Target in der Krebsforschung herauskristallisiert hat und dies ebenfalls in den Bakterien vertreten ist, bietet dieses Enzym einen neuen Ansatzpunkt in der Aufklärung des Wirkmechanismus von Goldkomplexen in der antibakteriellen Therapie. Daher wurde der Fokus dieser Arbeit auf den unterschiedlichen Aufbau, den Mechanismus und die inhibitorischen Eigenschaften von Goldkomplexen auf die TrxR der Säugetiere und der Bakterien gelegt.

1.6 Die Thioredoxinreduktase als Target von Zytostatika und Antibiotika

Die Thioredoxinreduktase (TrxR) ist eine Pyridinnukleotiddisulfidoxidoreduktase und zählt damit zu der Familie der Flavoproteine. [163] Flavoenzyme enthalten als prosthetische Gruppe Flavine wie das Flavinadenindinukleotid (FAD) oder Flavinmononukleotid (FMN) zur Übertragung von Elektronen. Diese Flavine sind strukturell durch einen Isoalloxazinring charakterisiert, welcher unterschiedlich substituiert sein kann (Abb. 15). [164] Weitere strukturell- und mechanistisch verwandte Enzyme dieser Klasse sind die Glutathionreduktase, die Lipoamiddehydrogenase, die Trypanothionreduktase, die Quecksilberreduktase und die NADPH-Peroxidase. [163, 165]

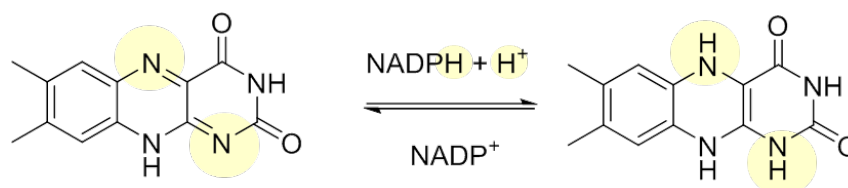


Abb. 15: Redoxreaktion des Isoalloxazolins

Es wurden zwei verschiedene Thioredoxinreduktasen gefunden, die sich strukturell als auch mechanistisch voneinander unterscheiden. Eine Form ist bei den höheren Eukaryonten, wie den Säugetieren, zu finden. Die andere Form tritt in niederen Eukaryonten und Prokaryonten auf. [165, 166] Beide Enzyme katalysieren NADPH-abhängig die Reduktion des natürlichen Substrats Thioredoxin, welches in den Organismen eine Reihe von wichtigen Schlüsselfunktionen zur Aufrechterhaltung des Redoxhaushalts besetzt. [165, 166]

Die Hauptaufgaben des Thioredoxinsystems bestehen in der Aufrechterhaltung der zellulären Redoxhomöostase und dem Schutz vor oxidativem Stress. Das Thioredoxin stimuliert das Zellwachstum und hemmt gleichzeitig die Apoptose. [167] Es reguliert die Genexpression durch die Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren [167, 168]

und liefert die Redoxäquivalente für antioxidative Enzyme wie der Thioredoxinperoxidase zur Deaktivierung von Peroxiden [169] oder der Ribonukleotidreduktase, welche, als einen wichtigen Schritt in der DNA-Synthese, die verschiedenen Nukleotide zu ihren Desoxyribonukleotiden reduziert. [170]

Da das Thioredoxin als auch die Thioredoxinreduktase in vielen Tumorzellen überexprimiert wird, stellt das Thioredoxinsystem eine etablierte Zielstruktur in der Krebstherapie dar. [167, 168]

Die TrxR bietet speziell für viele grampositive Erreger eine neue Zielstruktur in der antibakteriellen Therapie. Es ist bekannt, dass in vielen grampositiven Bakterienstämmen kein Glutathion zu finden ist, während es in den meisten gramnegativen Stämmen dagegen nachgewiesen werden konnte. [171, 172] Das Glutathionsystem ist zum großen Teil in vergleichbare Prozesse involviert wie die Thioredoxinreduktase. [173, 174] So liefert das Glutathion Redoxäquivalente für antioxidative Enzyme, wie der Glutathionperoxidase oder der Reduzierung von Ribonukleotiden. Das Glutathion stellt dazu eine Cysteinreserve für die DNA-Synthese dar und wird im Prozess der Detoxifikation von Xenobiotika oder zur Regulierung von thiolhaltigen Enzymen durch die Glutathion-S-Transferasen an diese Strukturen konjugiert. [175, 176]

Da beide Redoxsysteme eine große Schnittmenge bezüglich ihrer Aufgaben aufweisen, kann die Hemmung des Thioredoxinsystems bei den grampositiven Erregern einen größeren Schaden hervorrufen als bei den gramnegativen, die diese eine Inhibition der Thioredoxinreduktase nicht mit der Glutathionreduktaseaktivität ausgleichen können. [173] Mit dieser Strategie ist es möglich eine selektive Wachstumshemmung zwischen den verschiedenen Bakterienstämmen zu erreichen.

1.6.1 Thioredoxinreduktase der Säugetiere

1.6.1.1 Aufbau und Eigenschaften

Die TrxR der höheren Eukaryonten ist ein Homodimer mit einer relativen Molekülmasse von 55 kDa (ohne FAD) pro Untereinheit. [177] Jede Untereinheit besteht aus einer Aminosäurekette, welche eine FAD- und eine NADPH-Bindedomäne, als auch zwei aktive Zentren besitzt (Abb. 16 oben links). Die Bindung zum Cofaktor FAD ist sehr stabil. [165] Ein aktives Zentrum ist in der FAD-Bindedomäne lokalisiert, das andere am flexiblen C-Terminus in der Interfacedomäne. [166]

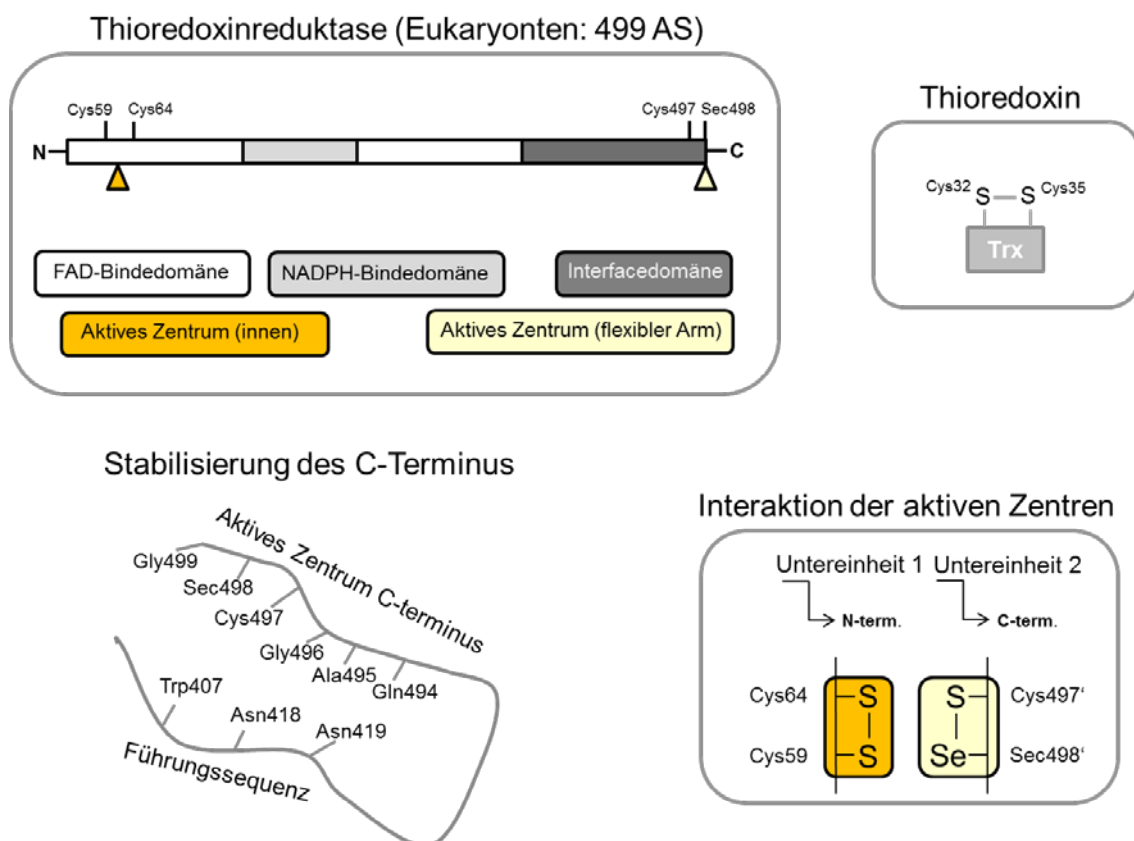


Abb. 16: Struktur der Thioredoxinreduktase der Eukaryonten modifiziert nach Mustacich et al. [166] (oben links), Struktur des Thioredoxins (Trx) (oben rechts), Stabilisierung des flexiblen Arms des C-Terminus mit dem zweiten aktiven Zentrum durch die Führungssequenz der gleichen Untereinheit (unten links) und Interaktionsdarstellung der beiden Untereinheiten beim Elektronentransport während der Katalyse (unten rechts)

Das aktive Zentrum am N-Terminus der Sequenz liegt im Inneren des Enzyms und ist schwerer zugänglich. Es besteht aus sieben Aminosäuren, welche Cys64 und Cys59 beinhalten. Die Cysteine liegen während des katalytischen Prozesses entweder als Disulfidbrücke oder als reduzierte Thiole vor. [178] Das zweite aktive Zentrum bilden die letzten sechs Aminosäuren des flexiblen Arms des C-Terminus an der Oberfläche des Enzyms. Das zweite aktive Zentrum wurde bislang nur bei den Enzymen der höheren Eukaryonten der Säugetiere gefunden. Die Besonderheit ist der Austausch eines Schwefelatoms gegen ein Selen, sodass hier das Cys497' mit dem Sec498' interagiert. Das Selenocystein wurde bis jetzt nicht bei der TrxR der Prokaryonten, als auch nicht bei der humanen Glutathionreduktase gefunden. Die größere katalytische Effizienz der Säugetier-TrxR wird auf das Selenocystein zurückgeführt, ihr leicht zugängliches aktives Zentrum führt dabei zu einer breiteren Substratspezifität im Vergleich zur bakteriellen TrxR. [177–179] Da zwischen der humanen TrxR und dem aus der Rattenleber isolierten Pendant eine sehr große Homologie besteht, ist diese Säugetier-TrxR ein vielfach verwendetes Modellenzym in der biologischen Testung. [166, 178, 180]

1.6.1.2 Mechanismus

Der Reduktionsmechanismus des natürlichen Substrats Thioredoxin (Trx) wurde anhand von Kristallstrukturen von Fritz-Wolf et al. [181] detailliert dargestellt. Die Katalyse der TrxR erfolgt ohne größere Konformationsänderungen im Enzym. Die Elektronenübertragung erfolgt über die Cofaktoren auf das innere aktive Zentrum der einen Untereinheit, dann weiter über das flexible aktive Zentrum einer zweiten Untereinheit (Abb. 16 unten rechts) zum Substrat.

Der Zyklus beginnt mit der Elektronenübertragung vom NADPH über das FAD auf die oxidierte Disulfidbrücke (Cys64/Cys59) des N-Terminus der Untereinheit 1 (Abb. 17). Der

flexible Arm des C-Terminus der Untereinheit 2 liegt dem aktiven Zentrum des N-Terminus der Untereinheit 1 mit einem geringen Abstand von 13 Å gegenüber. Das aktive Zentrum des C-Terminus (Cys497'/Sec498') liegt hier oxidiert vor und wird durch das aktive Zentrum des N-Terminus (Cys64/Cys59) reduziert. Ein weiteres Äquivalent NADPH reduziert nun erneut das aktive Zentrum des N-Terminus, dabei wird der C-Terminus etwas weggeschoben. Das physiologisch deprotoniert vorliegende Selenol (Sec498') des C-Terminus greift nun die Disulfidbrücke (Cys32/Cys35) des oxidierten Substrats Trx an und bildet einen kovalenten Enzym-Substrat-Komplex mit Cys32 aus. Bei dieser Reaktion drehen sich die letzten vier Aminosäuren (496' bis 499') vom aktiven Zentrum des C-Terminus dem Substrat zu.

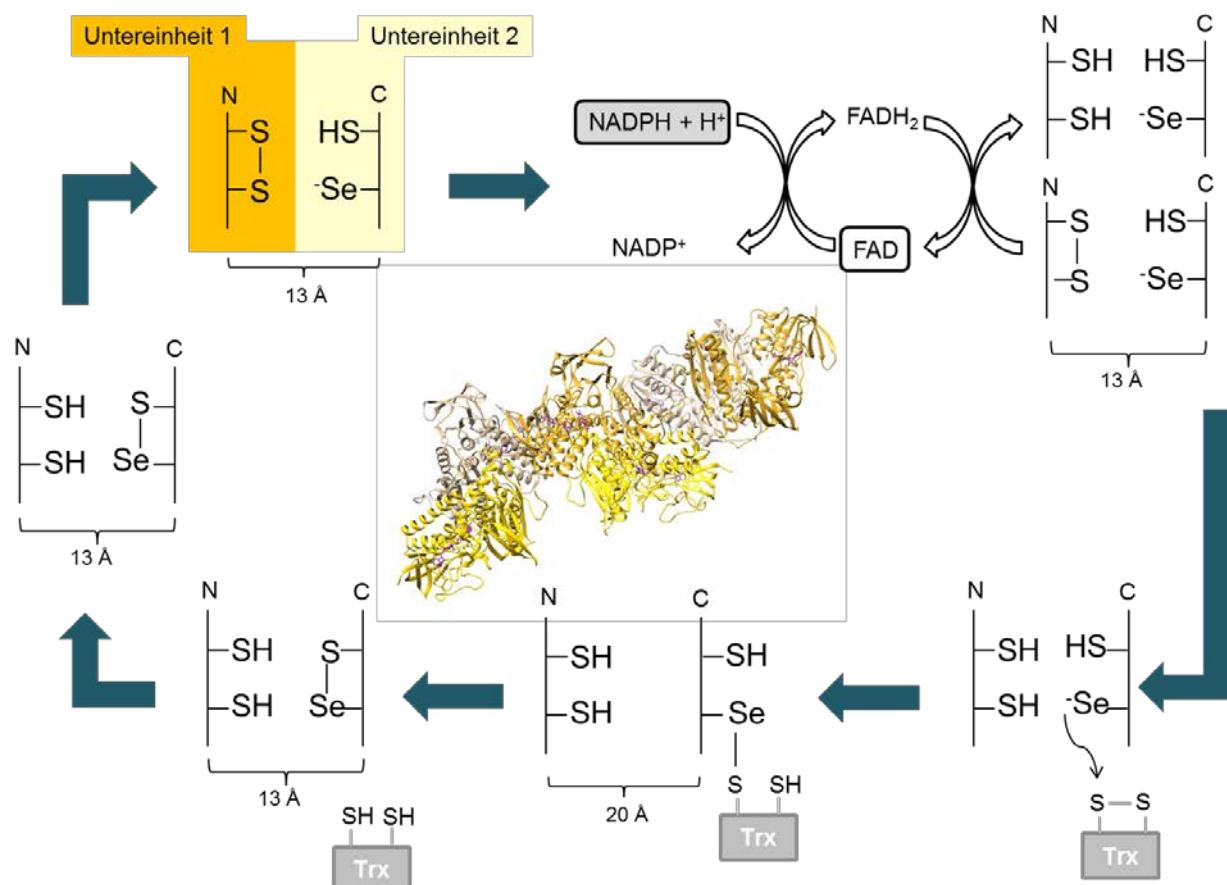


Abb. 17: Mechanismus der Reduktion des Thioredoxins in Eukaryonten (PDB code: 2CFY)

Der Abstand zu der Kette der anderen Untereinheit vergrößert sich auf 20 Å. Das Cys497' des C-Terminus überträgt nun über Wassermoleküle sein Proton auf die gemischte Sulfidselenitgruppe des Enzym-Substrat-Komplexes, wodurch die Bindung gespalten wird und sich eine neue intramolekulare Bindung zwischen den oxidierten Cys497' und Cys498' ausbildet. Das reduzierte Trx wird freigesetzt und der C-Terminus der Untereinheit 2 dreht sich von der Enzymoberfläche folglich weg, zum innen liegenden aktiven Zentrum des N-Terminus, um erneut reduziert werden zu können (Abb. 17).

Eine wichtige Funktion haben während des gesamten Zyklus die Aminosäuren Trp407', Asn418' und Asn419' der zweiten Untereinheit. Diese fungieren als Führungssequenz für das aktive Zentrum der selben Untereinheit, welche die letzten sechs Aminosäuren (495' bis 499') darstellt (Abb. 16 links unten). Sie stehen kontinuierlich im Kontakt (Gln494' und Ala495') und schränken die freie Bewegung des flexiblen Arms über starke Wasserstoffbindungen während der Katalyse für einen kontrollierten Elektronentransfer ein.

1.6.2 Bakterielle Thioredoxinreduktase

1.6.2.1 Aufbau und Eigenschaften

Die bakterielle TrxR besteht aus zwei gleich aufgebauten Untereinheiten von 35 kDa [177], welche ebenfalls jeweils als prothetische Gruppe ein FAD und eine redoxaktive Disulfidgruppe enthalten. [165] Das aktive Zentrum liegt in diesem Fall auf der NADPH-Domäne (Abb. 18 links und rechts oben). Die Untereinheiten sind kleiner als bei der TrxR der Säugetiere und enthalten kein Selenocystein. [165]

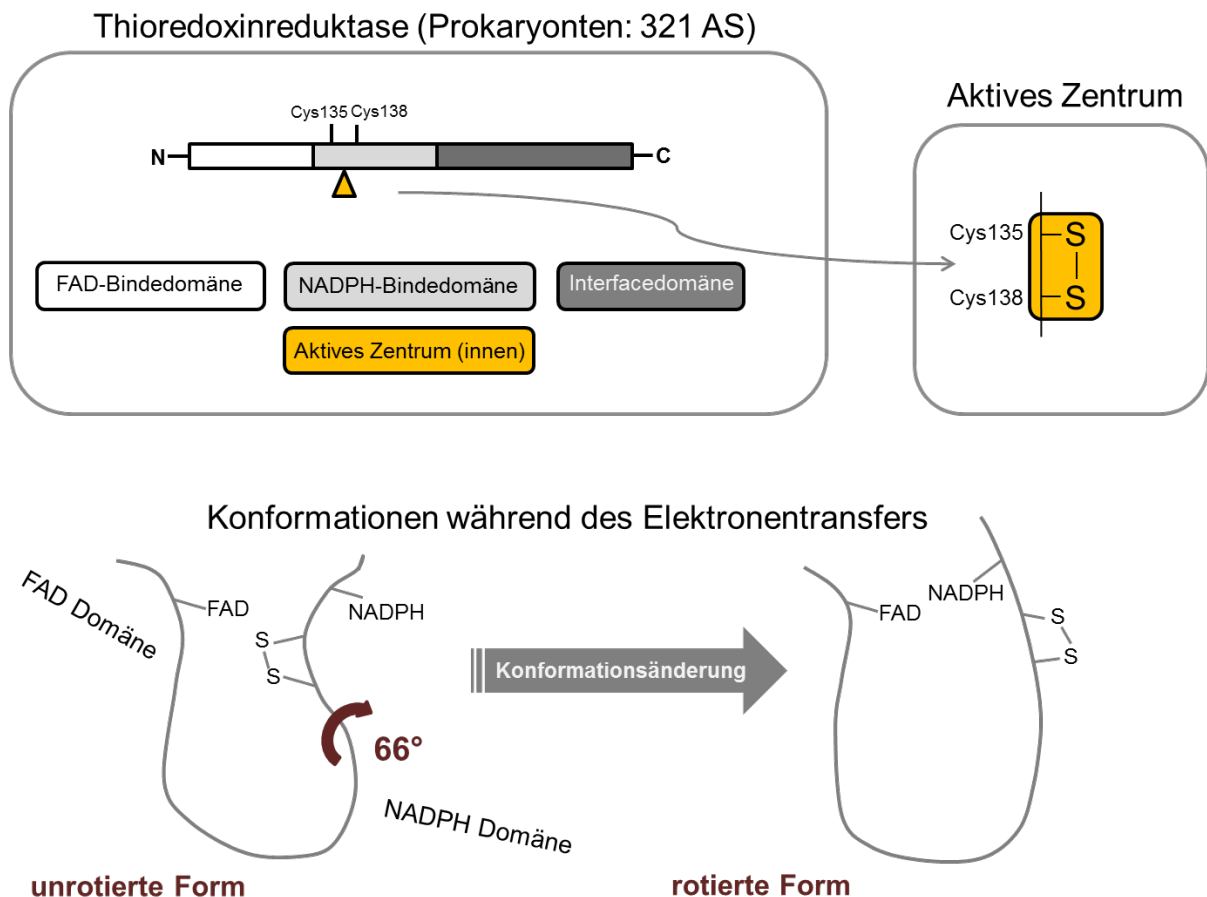


Abb. 18: Struktur der Thioredoxinreduktase der Prokaryonten modifiziert nach Mustacich et al. [166] (oben links), Darstellung des aktiven Zentrums der *E.coli* TrxR (oben rechts) und die Darstellung der Konformationsänderung während der Katalyse (unten)

1.6.2.2 Mechanismus

Der grundlegende Mechanismus des Enzyms wurde von Williams [182] dargestellt und später von Veine et al. [183] intensiver untersucht. Daraus geht hervor, dass die bakterielle Thioredoxinreduktase in einem ständigen Gleichgewicht zwischen zwei konformeren Strukturen steht, in denen die NADPH-Domäne durch eine größere Drehung entweder das gebundene NADPH oder das aktive Zentrum mit der Disulfidbrücke in den Reaktionsradius des Cofaktors FAD gelangt (Abb. 18 unten). Bei der Katalyse bindet der Elektronenlieferant NADPH an die entsprechende Bindedomäne im Molekül, die Übertragung der Elektronen auf das FAD kann somit nur in der rotierten Form erfolgen. Ändert das Molekül seine

Konformation in die unrotierte Form, wird der Abstand zwischen den Cofaktoren vergrößert und zum aktiven Zentrum auf der NADPH-Bindedomäne gleichzeitig verringert. Das FAD kann in diesem Zustand die Disulfidbrücke der Cysteine reduzieren. Das Cys138 des katalytischen Zentrums bindet während der Spaltung der Cys32-Cys35-Bindung des Trx an das Cys32 des Substrats. [183] Wenn das Trx nach der Reduktion freigegeben wurde, kann die Disulfidbrücke im aktiven Zentrum des Enzyms erneut reduziert werden (Abb. 19). In diesem Prozess ist das Cys138 der elektronenaufnehmende Part, als auch die interagierende Aminosäure mit dem Substrat. [183]

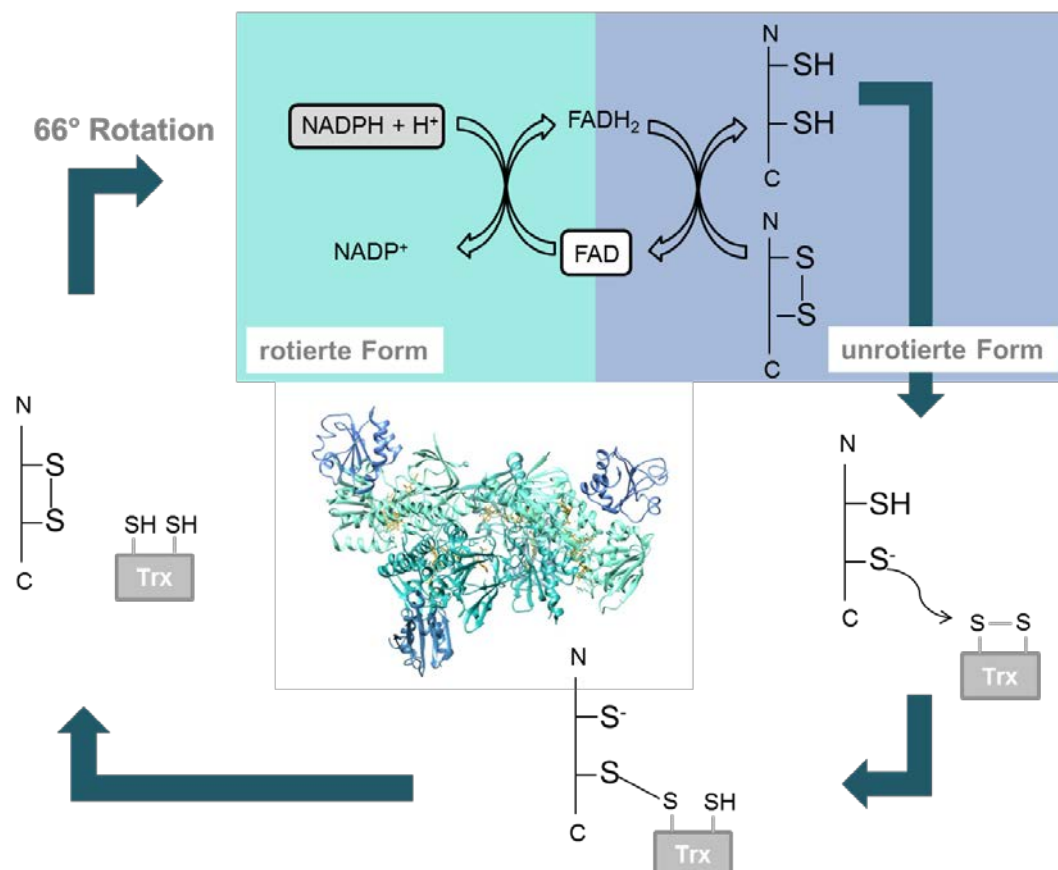


Abb. 19: Mechanismus der Reduktion des Thioredoxins in Prokaryonten (PDB code: 16FM)

1.7 Modifizierungen von Arzneistoffen mit Halogenen

1.7.1 Aktuelle Entwicklungen und Halogenbindungen

Halogenhaltige Verbindungen haben in der aktuellen Arzneistoffentwicklung einen großen Stellenwert. Ihr Anteil beträgt beim Eintritt in die klinischen Studien derzeit ca. 34 %. Nach erfolgreicher Markteinführung trägt immerhin noch jeder vierte Arzneistoff ein Halogen. In den letzten Jahren ist dabei auffällig, dass vermehrt fluoriierte Arzneistoffe, im Vergleich zu Verbindungen welche schwere Halogene wie Chlor, Brom oder Iod enthalten, in den klinischen Studien ausscheiden. [184]

Die große Anzahl von Organohalogenverbindungen spricht für einen Einfluss auf die Arzneimittelwirkung durch eine direkte Interaktion mit den Zielstrukturen oder einer Beeinflussung von Strukturen, welche mit der Bioverteilung in Verbindung stehen. In diesem Zusammenhang werden die Halogenbindungen aktuell stark diskutiert. [184]

Bei der Halogenbindung handelt es sich um die nicht kovalente Interaktion eines organisch gebundenen Halogens mit einer nukleophilen Struktur. Die Bindung entsteht durch eine anisotrope Ladungsverteilungsdichte der Elektronen um den Halogenkern. Die Valenzelektronen bilden dabei einen ringförmigen negativen Ladungsgürtel aus. Daraus resultiert eine Polarisierung der Atomoberfläche und es entsteht eine positive Partialladung in Richtung der Kohlenstoffhalogenbindungsachse: das sogenannte σ -Hole.

Ist die elektrostatische Partialladung groß genug, kann das Halogen mit der Prävalenz zu den ungebundenen Elektronenpaaren von sauerstoffhaltigen nukleophilen Lewis-Basen und Anionen eine lineare nicht kovalente Bindung ausbilden. [185]

Diese Bindungen sind bei den verschiedenen Halogenen unterschiedlich stark ausgeprägt. Ihre Stärke nimmt von Fluor zu Iod hin zu und geht mit der Polarisierbarkeit der Atome und ihren Van-der-Waals-Radien einher (Abb. 20). [184–187]

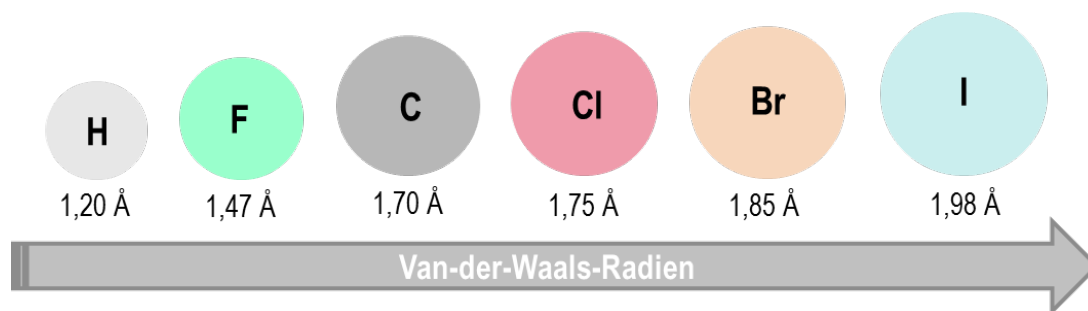


Abb. 20: Van-der-Waals-Radien nach Bondi [188]

Vielmals wurde postuliert, dass beim Fluor keine Halogenbindungen ausgebildet werden können. Dies wird dadurch begründet, dass Fluor aufgrund seiner hohen Elektronegativität im Vergleich zu den anderen Halogenen (Abb. 21) die Elektronen der σ -Bindung viel stärker, als der Rest des Moleküls, zu sich heranziehen kann, sodass das in diesem speziellen Fall das σ -Hole ausgeglichen wird. [184, 185]

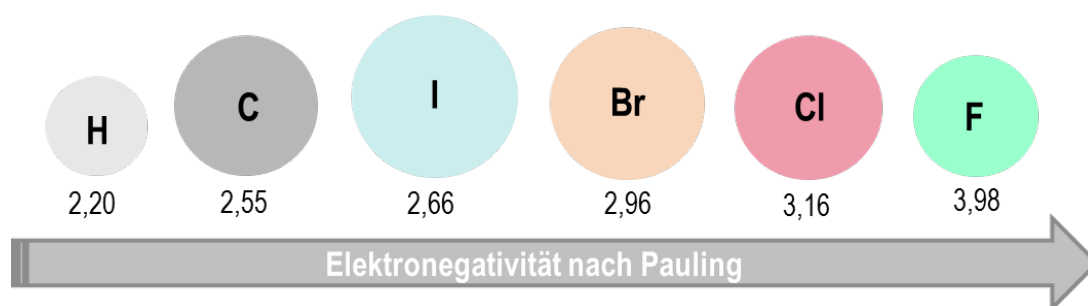


Abb. 21: Elektronegativitäten nach der Pauling Skala [189]

Gleichzeitig wird die These vom Ausgleich der Partialladung dadurch unterstützt, dass das Fluor im Vergleich zu den anderen Halogenen die größte Tendenz zur sp -Hybridisierung des nicht bindenden s -Orbitals besitzt, wodurch negative Bereiche entstehen, in denen der Kern nicht dominiert. Dieser Effekt unterstützt zusätzlich den Elektronenschub zum σ -Hole. [186]

Aktuelle Meinungen gehen hingegen davon aus, dass die Stärke der Wechselwirkungen stark durch den Molekülrest beeinflusst wird und gebundenes Fluor unter bestimmten Umständen das Potential hat Halogenbindungen auszubilden. Es wurde nachgewiesen, dass stark elektronenziehende Substituenten am Restmolekül die Halogenbindungen verstärken, während elektronenschiebende Reste die Bindung entweder nur abschwächen, wie im Fall von Brom und Iod, oder auch vollständig neutralisieren können, wie es bei Chlor und Fluor der Fall ist. [187]

Die Untersuchung der Effekte von Halogenbindungen über σ -Holes kann durch Kristallstrukturanalyse oder durch quantenmechanische Berechnungen erfolgen. Eine Evaluierung der Proteindatenbank (Protein Data Bank = PDB) durch Xu et al. [184] hat ergeben, dass ca. 17 % der Halogenbindungen zu Wassermolekülen ausgebildet werden und 83 % zu Biomolekülen (Proteine/Cofaktoren). Zwei Drittel der Bindungen zu Proteinen werden zum Rückgrat der Proteine und ein Drittel mit ihren Seitenketten ausgebildet. 19 % dieser Proteine sind in Bioverteilungsprozesse involviert. Die meisten Bindungen sind zwischen den Halogenen und Hydrolasen, Transferasen oder Oxidoreduktasen zu finden. [184]

Welches Halogen bei der Entwicklung und Optimierung von neuen Arzneistoffen den größeren Vorteil bringt, kann nicht pauschalisiert werden. Über die sinnvollste Strategie muss von Fall zu Fall entschieden werden und die Verbindung der entsprechenden Zielstruktur angepasst werden.

1.7.2 Fluor in der medizinischen Chemie

Das Halogen Fluor ist das elektronegativste Element im Periodensystem und mit seinem kleinen Van-der-Waals-Radius nur geringfügig größer als Wasserstoff (Tab. 20/21). [188, 189]

Wie in zahlreichen Publikationen beschrieben wurde, hat der Einbau von Fluor in organische Verbindungen bei der Arzneistoffentwicklung den Vorteil, dass die Größe des Moleküls kaum verändert wird. Zudem werden aber viele Eigenschaften des Fluorsubstituenten bewusst eingesetzt, um die metabolische Stabilität zu verbessern oder die Erhöhung der Bioverfügbarkeit, als auch der Bindungsaffinität von Wirkstoffen zu erzeugen. [190–197]

Durch die Substitution der para-Position des Phenylrests konnte bei dem Cholesterolaufnahmehemmer Ezetimib die Oxidation des CYP450 Enzyms verlangsamt und damit die Bioverfügbarkeit erhöht werden. [190, 193, 198] Bei dem COX-2 Inhibitor Celecoxib führte hingegen die gleiche Strategie in die entgegengesetzte Richtung. Der Austausch des para-Fluorsubstituenten durch eine Methylgruppe verringerte die Stabilität gegenüber CYP450. Somit konnte die Halbwertszeit drastisch auf ein gewünschtes Niveau verringert werden. Dieser Effekt ist nicht zu beobachten, wenn dem Fluor statt eines Kohlenstoffs ein Stickstoff in para-Position gegenübersteht. [190, 193, 199]

Einen weiteren Einfluss übt ein Fluorsubstituent auf benachbarte basische oder azide Gruppen aus. Aufgrund seiner großen Elektronegativität und dem negativen induktiven Effekt wird die Azidität erhöht und die Basizität verringert, da die Deprotonierung durch die Stabilisation des entstehenden Anions unterstützt und die Protonierung erschwert wird. Im Fall von 5HT_{1D}-Agonisten, welche in der Migränebehandlung eingesetzt werden, konnten die Azidität verstärkt und somit die orale Bioverfügbarkeit erhöht werden. [190, 193, 200] Durch die Modifizierung der Säure/Base-Eigenschaften kann die Wirkstoff-Protein-Interaktion verbessert werden, wie es in der Glaukomtherapie bei fluorierten Sulfonamiden als

Carboanhydrase II Hemmer beobachtet werden konnte. [190, 193, 201] Im Fall vom modifizierten Fluormethotrexat in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis konnten dagegen die Nebenwirkungen durch Verhinderung der polyglutamylierungsinduzierten Toxizität reduziert werden. [193, 202]

In der bakteriellen Therapie sind die Fluorquinolone weit verbreitete effektive Antibiotika. Ihre Potenz wird der sehr guten Gyraseinhibition zugeschrieben, wobei der Fluorsubstituent die Proteinbindung des Arzneistoffs erhöht und zusätzlich die Membrangängigkeit steigert. [190, 193, 203] Gleiche Beobachtungen wurden für GABA (Gamma-Aminobutyric Acid)-bioisostere Difluorphenole in der antikonvulsiven Therapie gemacht. Da der Neurotransmitter GABA aufgrund seiner Polarität nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren kann und somit nicht sinnvoll applizierbar ist, konnten stattdessen diese neuen Verbindungen eingesetzt werden. Sie sind durch ihre höhere Lipophilie membrangängig und hemmen dort kompetitiv die GABA-Aminotransferase, um damit den Neurotransmitterabbau zu verringern. [192, 193, 204]

Auch in der Krebstherapie sind viele verschiedene fluorierte Verbindungen in der Anwendung oder in der klinischen Prüfung. Der bekannteste Arzneistoff ist hier der Antimetabolit und Inhibitor der Thymidylatsynthase 5-Fluoruracil. Obwohl diese Verbindung bis heute noch häufig eingesetzt wird, liegen die Nachteile seiner Anwendung in seinem kardiotoxischen und neurotoxischen Potential. [191, 205]

Weitere fluorierte Zystostatika findet man ebenfalls unter den Topoisomeraseinhibitoren, Mikrotubulistabilisatoren [206], Antiöstrogenen, Antiandrogenen oder Proteinkinaseinhibitoren. [191]

Durch das Aufkommen der Resistenzen gegen verschiedene Chemotherapeutika ist ein weiterer Ansatz die Hemmung von in Tumorzellen überexprimierten Effluxtransportern, wie den Transportproteinen der ABC (ATP-binding cassette) Familie. Die bekanntesten Beispiele

sind das P-glycoprotein (P-gp) (MDR1/ABCB1) und das Multidrug resistance associated Protein (MRP1/ABCC1). [207–209] Ein vielversprechender P-gp Inhibitor, welcher die Phase III der klinischen Studien bereits durchlaufen hat, ist die difluorierte Verbindung Zosuquidar. [208, 210]

Diese Beispiele zeigen, dass Fluor ein viel verwendeter Substituent in der medizinischen Chemie ist, der teilweise gut lenkbare Eigenschaften besitzt und für die gezieltere Entwicklung neuer Arzneistoffe eingesetzt werden kann.

1.7.3 Brom in der medizinischen Chemie

Brom hat in der medizinischen Chemie bis jetzt wenig Beachtung bekommen. Die bereits erwähnten Publikationen über den Einsatz von Halogenen in der Medizin zeigen, dass der Fokus bis jetzt vor allem auf den Fluorverbindungen lag.

Unter den bereits zugelassenen Medikamenten sind Bromverbindungen vor allem als Bromsalze in verschiedenen Arzneistoffklassen wie den Parasympatholytika, Spasmolytika, in der Behandlung von Asthma bronchiale, COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease) und als peripher wirksame Muskelrelaxanzien zu finden. In weiteren Bereichen, wie dem GABA-Rezeptor-Modulatoren oder Neuroleptika, ist das Brom kovalent gebunden vorzufinden. Die Strukturwirkungsbeziehungen sind in diesem Bereich kaum erforscht. [34]

Brom hat im Vergleich zum Wasserstoff (1,20 Å) und Fluor (1,47 Å) einen größeren Van-der-Waals-Radius (1,85 Å). Seine Elektronegativität und Größe sind nur geringfügig größer als die des Kohlenstoffs (1,70 Å). [188] Allerdings ist Brom durch seinen großen Radius an der Atomoberfläche leichter polarisierbar. Dadurch können stabile Halogenbindungen ausgebildet werden, welche durch die Einführung von elektronenziehenden Substituenten im Restmolekül noch zusätzlich verstärkt werden können. [184, 186, 187] Dies bietet dem Wirkstoffmolekül eine weitere Interaktionsmöglichkeit mit Zielstrukturen, die für die Aktivität

von Bedeutung sein können. Für Brom ist bekannt, dass in der PDB sehr viele Halogenproteinbindungen zu finden sind. Dabei zeigt Brom π -Interaktionen vor allem zu den Aminosäuren Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr), Histidin (His) und Tryptophan (Trp) (Abb. 22) und dabei eine große Affinität zu Sauerstoffgruppen. Allerdings konnten auch Bezüge zu Stickstoff und Schwefel gefunden werden. [184]

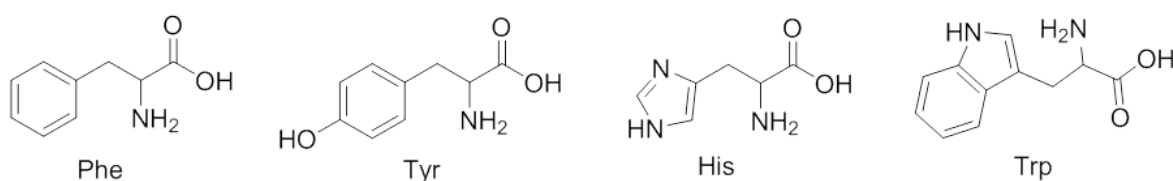


Abb. 22: Aminosäuren, welche mit Brom π -Bindungen eingehen von links nach rechts in ihrer Häufigkeit nach geordnet [184]

Während der „große Boom“ der Fluorverbindungen langsam zurückgeht, werden vermehrt Arzneistoffe mit schweren Halogenen zugelassen. Insgesamt wurde der Einfluss von Brom auf die Strukturwirkungsbeziehungen noch nicht so gut erforscht wie für das Fluor. Eine genauere Untersuchung der Eigenschaften, dem Interaktions- und Modulationspotential von Organobromverbindungen sind daher vielversprechend. [184]

1.8 Quantitative Analytik von Halogenen

1.8.1 Methoden zur Analytik von Halogenen in biologischen Proben

Zur Quantifizierung von Halogenen stehen im Prinzip eine große Zahl von State of the Art-Methoden wie die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS), die optische Emissionsspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES), die Ionenchromatographie (IC), die potentiometrische Bestimmung mit einer ionenselektive Elektrode (ISE), die Totalreflektion Röntgenfluoreszenz Analyse (TXRF), die Neutronenaktivierungsanalyse (NAA), die Kapillarelektrophorese (CE) oder die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) zur Verfügung. [211–213] Nicht alle diese Techniken lassen sich für die Bestimmung jedes Halogens verwenden. Einen großen Unterschied macht zudem auch, ob das Halogen ionisch oder kovalent gebunden vorliegt. Oftmals sind Extraktionsschritte oder die Zersetzung der Substanz vor der Messung erforderlich, um den Analyten mit ausreichender Selektivität und Sensitivität quantifizieren zu können. [211, 212]

1.8.2 Die hochauflösende Kontinuumsstrahler-Atomabsorptionsspektroskopie

Die Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) ist eine spektroskopische Methode, die zur Quantifizierung von Metallen im Bereich der Spurenanalytik eingesetzt wird. Hierbei werden die einzelnen Atome in der Gasphase mit der Strahlung einer elementspezifischen Wellenlänge angeregt und die Intensität vor und nach der Einstrahlung auf die Probewolke gemessen und ins Verhältnis gesetzt. Die Intensität der Absorptionslinien verhält sich dabei linear zur Anzahl der Atome im Strahlengang, und damit zur Konzentration. [214] Der Zusammenhang wird durch das Lambert Beer'sche Gesetz ausgedrückt. Die Gleichung gilt nur für stark verdünnte Lösungen und monochromatisches Licht einer bestimmten Wellenlänge. [214]

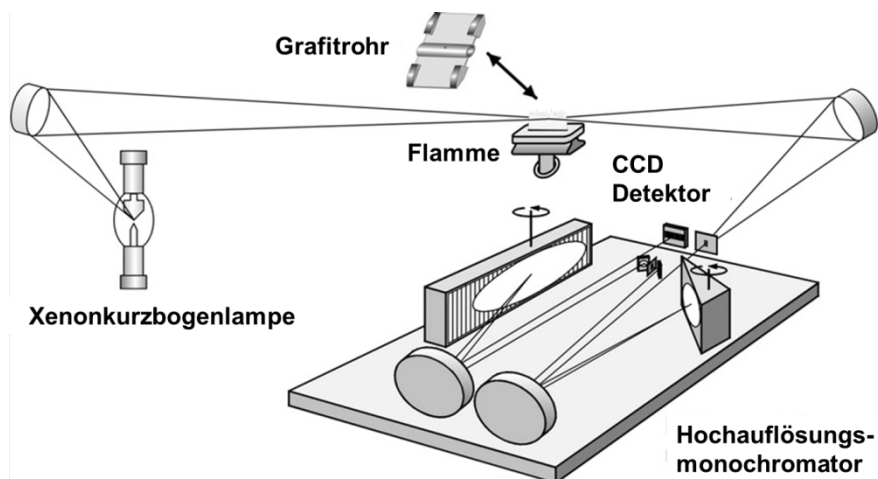


Abb. 23: Darstellung des CS-AAS Geräts verändert nach Becker-Ross et al. [215]

Der Anregungsbereich eines Atomabsorptionsspektrometers ist abhängig von der Strahlungsquelle und deckt bei den neusten Xenonkurzbogenlampen den Bereich von 193,7 nm (Resonanzlinie des Arsens) bis 852,1 nm (Resonanzlinie des Cäsiums) ab. Der Vorteil dieser Lampe im Vergleich zu älteren Linienstrahlern (Hohlkathodenlampe) oder Kontinuumstrahlern (Deuteriumlampe) ist neben der großen Anzahl von messbaren Elementen, durch die große Bandbreite an einstellbaren Wellenlängen, die Modifikation der Elektrodenform (Abb. 23). Dadurch kann auch im intensitätsschwachen UV-Bereich eine vielfach höhere Intensität im Vergleich zu den herkömmlichen Modellen erreicht werden. [214, 216]

Die Atomisierungseinheit kann ein Grafitrohr (GF) oder auch die Flamme (F), zum Beispiel in Form eines Luft/Acetylen-Gemischs, sein (Abb. 23). Die Vorteile der GF-Technik gegenüber der F-Technik ist die 20- bis 30-fach höhere Empfindlichkeit durch die Verwendung eines inerten Spülgases, die höheren Atomisierungstemperaturen, der geringere Probenverbrauch im μL -Bereich (statt mL-Bereich), als auch der geringere Matrixeinfluss auf das Messsignal, welche durch die unterschiedliche Dichte und Viskosität der Matrixlösung verursacht werden können. [214, 217]

Ein weiterer Vorteil der neuen HR-CS (High Resolution Continuum Source) Technik im Vergleich zur klassischen AAS ist die verbesserte kontinuierliche Untergrundkorrektur. Die HR-CS AAS verwendet eine CCD (Charged Coupled Device)-Zelle mit 200 kleinen Einzeldetektoren (Abb. 23). Dadurch kann das Messsignal, als auch der Untergrund, nebeneinander und unabhängig voneinander, über die gesamte Messzeit detektiert werden. Daraus resultiert eine höhere Signalauflösung als bei der Deuterium- oder Zeeman-Untergrundkorrektur. Die Untergrundkorrektur mit der Deuteriumlampe ist nur über einen begrenzten Wellenlängenbereich anwendbar und da dabei zwei Lampen parallel angewendet werden, führt dies zu einem größeren Rauschen. Bei der Zeeman-Korrektur ist der teils sehr große Empfindlichkeitsverlust bis zu 40 % und der kleine Kalibrierbereich durch die Beschränkung des Roll-Over Effekts als nachteilig zu bewerten. [214, 216]

Durch den technischen Fortschritt der Untergrundkorrektur können mit der AAS-Methode auch Verbindungen vermessen werden, deren Resonanzlinien außerhalb des Anregungsbereichs der Xenonkurzbogenlampe liegen. Dazu werden Molekülbildungsreagenzien vor der Atomisierung zu der Probe dazugeben, aus denen sich dann mit dem Analyten „zweiatomige“ stabile Verbindungen bilden. Diese Moleküle liegen bei den entsprechenden Atomisierungstemperaturen undissoziiert vor und ihre Resonanzlinien können ebenfalls detektiert werden. [214, 216] Die Technik wird als molekulare Absorptionsspektroskopie (MAS) bezeichnet. Beispiele für die vielfache erfolgreiche Quantifizierung mit der MAS sind für die Halogene Fluor [218–231], Chlor [218, 219, 232, 233], Brom [219, 234–237] und Iod [219, 238] als auch Schwefel [218–220, 239–249] und Phosphor [218, 219, 228, 249–257] zu finden.

1.8.3 Verwendete Techniken zur Quantifizierung von Brom und Fluor

Brom kann mit allen genannten Techniken und ausreichender Sensitivität bestimmt werden. Am häufigsten werden die ICP-MS und NAA-Technik angewendet. Bei der Fluorquantifizierung treten bei einigen der aufgeführten Techniken Probleme auf. Für die ICP-Applikationen ist das Halogen im Plasma zu schlecht ionisierbar und emittiert dazu Linien im Vakuum-UV-Bereich, welche für die meisten Detektoren nicht zugänglich sind und zu schlechten Detektorsensitivitäten führen. Bei der TXRF-Technik sind die Fluoreszenzausbeuten des Fluors sehr gering, daraus resultieren schlechte Nachweisgrenzen. Auch in der NAA sind sehr starke Interferenzen beobachtet worden. Am meisten werden daher derzeit für die Fluoranalytik die MAS oder IC verwendet. Eine günstige und effektive Methode stellt ebenfalls die ISE dar. Hier kann bei der Verwendung einer Lanthanfluoridelektrode mit wenig Aufwand und einer guten Selektivität und Sensitivität gemessen werden. [258] Der Nachteil ist der geringe Probendurchlauf. Nur in der MAS ist die direkte Quantifizierung auch von organisch gebundenem Fluor, ohne vorherige aufwendige Probenvorbereitung, möglich. Dies ist ein klarer Vorteil dieser Technik und erklärt auch das immer breiter werdende Anwendungsgebiet.

Die MAS Methode ist für beide Halogene anwendbar. In der Fluoranalytik ist die Methode derzeit schon die am meisten verwendete, während es für Brom viele Alternativen gibt. Obwohl die geringere Sensitivität im Vergleich zur etablierten Metallquantifizierung mit der AAS und den ICP Methoden liegt und das Grafitrohr oft durch Modifier vorbehandelt werden muss, stellt dies doch einen verhältnismäßig geringen Aufwand dar, um die Halogene aus den verschiedensten biologischen Matrices ohne aufwendige Probenvorbereitung zu quantifizieren. Probenaufschlüsse von Organohalogenverbindungen sind nicht nötig. Die Matrixeffekte bleiben im Durchschnitt eher gering. Die AAS/MAS bietet somit ein gutes

ökonomisches Verhältnis zwischen den Kosten für die Anschaffung und Unterhaltung eines AAS-Geräts und einem hohen Probendurchsatz.

Die MAS-Applikationen für Brom beschränken sich seit der Einführung der verbesserten HR-CS AAS vor allem auf die GF-Technik zur Bestimmung von Bromsalzen in wässrigen Lösungen [235, 236] des organisch gebundenen Brom im Arzneistoff Bromazepam [236] oder zur Quantifizierung in festen Matrices, wie Polymeren [234] oder Kohle [237]. Die meisten dieser Publikationen fokussieren sich dabei auf Calciumnitrat als Molekülbildungsreagenz und die Verbesserung der Quantifizierung des Broms über das Calciummonobromid (CaBr). Ältere Arbeiten stellen auch die Verwendung von Indium-, Gallium- [259] Thallium- [260] und Aluminiumsalzen [261, 262] in Kombination mit der GF-Technik und Indium- und Aluminiumsalzen [263] mit der F-Technik vor.

Aufgrund der wenigen Alternativen für die Fluorbestimmung liegt der Fokus mittlerweile stark auf der MAS Technik. Seit 1977 wurde eine Vielzahl von Publikationen von Tsunoda et al. und Dittrich für die klassischen AAS Geräte mit GF-Technik und F-Technik zur Fluorbestimmung mit Aluminium- [217, 264–266], Gallium- [217, 259, 265, 267], Indium- [217, 259, 265, 266], Thallium-, [265] und Magnesiumsalzen [268] veröffentlicht. Dabei gelang es bereits ionisches, als auch organisch gebundenes Fluor in wässrigen Lösungen, als auch in Obstblattextrakten zu bestimmen.

Die geringeren Nachweisgrenzen für Indium und Thallium als Molekülbildungsreagenzien, wurde mit den geringeren Dissoziationsenergien und der größeren Instabilität während der Atomisierungsphase begründet. Gallium- und Aluminiummonofluoride zeigen höhere Dissoziationsenergien und sind dadurch stabiler. [265] Die bessere Empfindlichkeit und der Einsatz von kleineren Probevolumina in der GF-Technik im Vergleich zur F-Technik [217,

268] führen dazu, dass sich die aktueller Forschung vor allem auf die GF-Technik in Kombination mit Aluminium oder Gallium konzentriert hat. [263]

Weitere Applikationen von Butcher zeigten die Quantifizierung von Ionen und Organofluorverbindungen in Zahnpüllösungen, Milchpulver und Austerngewebe mit Aluminumsalzen. [263] Die Probleme bei der Anwendung der GF- als auch F-Technik zur Zeit der klassischen AAS waren, trotz der Richtigkeit der Messwerte, die schlechte Präzision der Methoden.

Nach Einführung der HR-CS Technik konzentrierten sich die Weiterentwicklungen der Methoden vor allem auf Calcium und Gallium als Molekülbildungsreagenzien in Verbindung mit der GF-Technik. Der breit anfahrbare Wellenlängenbereich, die verbesserte Hintergrundkorrektur und die hohe spektrale Auflösung brachten der MAS-Technik bei richtigen Messwerten eine ebenso gute Präzision. Die GF-Technik ist bezüglich der Empfindlichkeiten und Nachweisgrenzen der F-Technik in wässrigen Lösungen, als auch in Feststoffmatrices, überlegen. [218, 256, 269]

Gleisner et al. konnten Fluor erfolgreich mit Gallium in Trinkwasser, Mineralwasser und Zahnpasta analysieren. [230, 231] Morés et al. haben Fluor mit Calcium in Teeaufgüssen erfolgreich vermessen können. [229] Wiederum unter dem Zusatz von Gallium konnten Krüger et al. organisch gebundenes Fluor in dem Zytostatikum 5-Fluoruracil in wässrigen Lösungen und in Zelllysaten quantifizieren [227]. Ozek et al. verwendeten Calcium zur Bestimmung von Fluorverbindungen in Milch und Abwasser [222, 226] als auch in türkischen Weinen. [270] Die bis heute empfindlichste Methode entwickelten Würtenberger et al. [271] Hierbei wurde auf alle typischen Modifizierlösungen verzichtet und das Grafitrohr nur mit einer Tantalfolie ausgekleidet. Neben der sehr guten Sensitivität und der verlängerten Lebenszeit des Grafitrohres konnte problemlos Fluor in Eisen(III)salophenkomplexen in wässrigen

Lösungen, als auch in Zelllysaten, mit Nachweisgrenzen von 5,79 – 6,08 pg quantifiziert werden (Abb. 24). [271, 272]

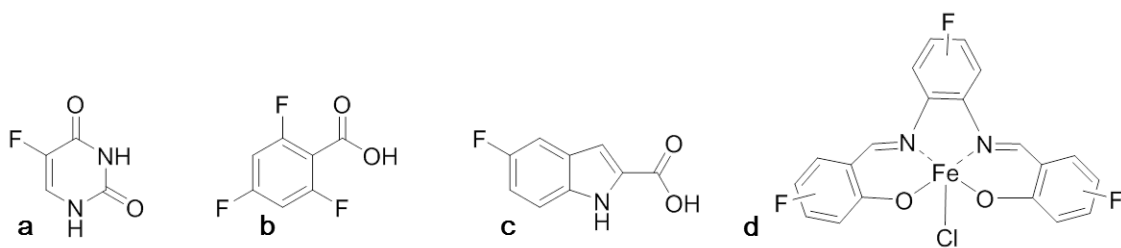


Abb.: Beispiele für die erfolgreiche Quantifizierung von organisch gebundenen Fluor mittels HR-CS MAS (a) 5-Fluoruracil [227], (b) 2,4,6-Trifluorbenzoesäure [264], (c) 5-Fluorindol-2-carbonsäure [264], (d) fluorierte Eisen(III)salophenkomplexe [272]

2 Fragestellungen und Zielsetzung des Projekts

Es wurden bereits im Vorfeld dieser Arbeit verschiedene neue Komplexe mit Gold(I)-, aber auch Ruthenium(II)- oder Rhodium(I) als Zentralatom und verschiedenen *N*-heterozyklischen Carbenen als Liganden, synthetisiert und hinsichtlich ihres Potentials als neue Therapeutika in der Krebstherapie biologisch untersucht. Hierbei konnten vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Diese beinhalteten Daten über die Zytotoxizität und Resistenzüberwindung gegenüber verschiedenen Krebszelllinien, Einflüsse auf Zebrafischembryonen (Modell-Organismus für Wirbeltiere zur Risikoabschätzung und Dosisfindung von neuen potentiellen Arzneistoffen) und die Hemmung von wichtigen krebsrelevanten Enzymen des Redoxsystems im Körper. Weiterführende Experimente gaben Aufschluss über die Bioverteilung und die Aufklärung ihrer Wirkmechanismen. [116, 144, 273–279]

Aus einigen direkten Vergleichen der verschiedenen Metall(I)-NHC Komplexe mit den exakt gleichen Liganden ging hervor, dass die Gold(I)komplexe und die Silber(I)komplexe bezüglich ihrer antimikrobiellen Aktivität entweder als gleichwertig anzusehen waren oder die Gold(I)komplexe den Silber(I)komplexen oftmals überlegen waren. [78, 86, 280]

Aufbauend auf diesen Ergebnissen und dem derzeitigen Stand der Forschung auf dem Gebiet der Organometallkomplexe, beinhaltet dieses Projekt die Weiterentwicklung, Charakterisierung und Modifizierung von neuen strukturverwandten Gold(I) *N*-heterozyklischen Carbenkomplexen und die Untersuchung ihrer antiproliferativen Eigenschaften gegenüber menschlichen (Tumor-)Zellen und verschiedenen Bakterienstämmen mit Hinblick auf ihre Strukturwirkungsbeziehungen.

Die Verbindungen dieser Arbeit sind Weiterentwicklungen der mono- und bis-NHC Gold(I) Komplexe mit Benzimidazolen von Rubbiani et al. [144, 274]

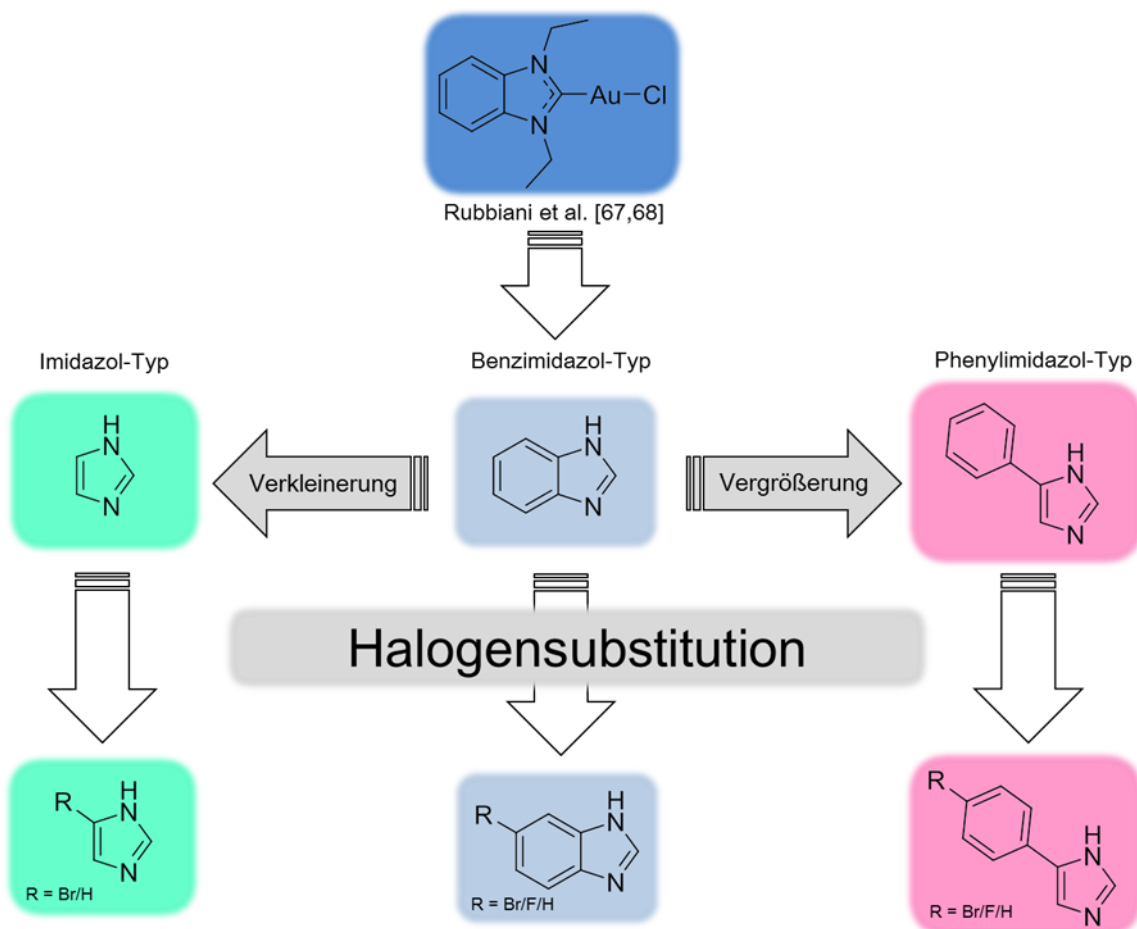


Abb. 24: Darstellung der Modifizierung der verschiedenen Liganden dieser Arbeit ausgehend von der aktivsten Verbindung vom Typ NHC-Au-Cl von Rubbiani et al. (dunkelblau)

Variationen der Stickstoffsubstituenten zeigten bereits, dass die *N,N*-Ethylierung, im Vergleich zu den anderen Substituenten der Reihe (*-N,N*-methyl, *-N,N*-diphenylmethyl, *-N,N*-benzyl) an einem Benzimidazolliganden (Abb. 25 dunkelblau), zu den höchsten wachstumshemmenden Effekten gegenüber verschiedener Tumorzelllinien führte.

Basierend auf dieser Leitstruktur sollten weiterführende Optimierungen über die Größenänderung des NHC-Liganden und der Einführung von analytisch detektierbaren Substituenten erfolgen. Die Größenänderung des Komplexes sollte durch einen Austausch des Benzimidazolgrundkörpers durch einen Imidazolgrundkörper und einen Phenylimidazolgrundkörper umgesetzt werden (Abb. 25). Als neue Substituenten am Aromaten sollten Halogene eingeführt werden. Diese bringen nicht nur eine Variation durch

die unterschiedlich starken elektronegativen Eigenschaften, sondern erhöhen durch ihre Van-der-Waals-Radien auch die Größe der Moleküle. Halogene können ebenfalls die Lipophilie im Molekül erhöhen und somit die Membranpermeabilität und Bioverfügbarkeit verbessern. Brom und Fluor sind durch entsprechende geeignete analytische Verfahren neben dem Metall detektierbar und können somit in weiterer Funktion als Sonde für den Liganden des Komplexes in Zellaufnahmestudien oder Proteinbindungstests dienen (Abb. 26).

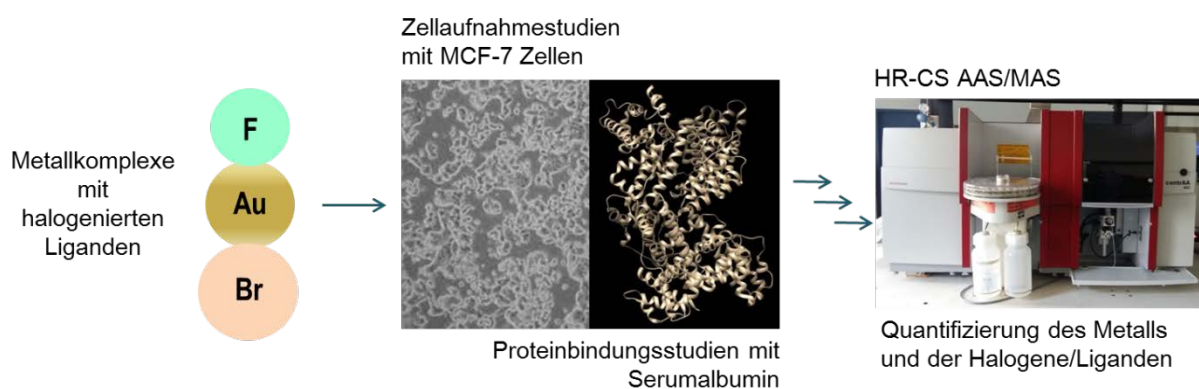


Abb. 25: Projektdesign und Ziele dieser Arbeit hinsichtlich der Metall- und Halogenanalytik

Ein Schwerpunkt sollte vor allem auf der umfangreichen Untersuchung der Bioverteilung dieser neuen Goldkomplexe liegen. Hierzu sollten die Liganden gesondert von dem Metall betrachtet und mit dem Metallgehalt verglichen werden, um weitere Informationen über die Stabilität der Strukturen zu erlangen.

Die Quantifizierung der potentiellen Metallwirkstoffe und ihren Vorstufen in der biologischen Testung sollte über photometrische oder spektroskopische Methoden erfolgen. Für die Bestimmung von Metallen ist die Atomabsorptionsspektroskopie die Methode der Wahl. Auf diese Weise lassen sich auch Goldatome der Organometallkomplexe in unterschiedlichen Matrices effektiv mit einem guten Kosten-Nutzen-Verhältnis bestimmen. Die alleinige Aussage über die Metallquantifizierung birgt einige Nachteile in sich. Es kann lediglich eine

Aussage über den Gehalt des Metalls, damit jedoch nicht zwingend über den gesamten Komplex getroffen werden. Mögliche Dissoziierungs- oder Umlagerungsreaktionen können auf diese Weise nicht näher betrachtet werden.

Die freien Liganden des Imidazol-, Benzimidazol- oder Phenylimidazol-Typs (Abb. 22) können nicht spezifisch neben ihrer koordinierten Form als Metallkomplex durch gängige photometrische Methoden oder Fluoreszenzverfahren quantifiziert werden. Eine Möglichkeit bestünde in der Markierung der Liganden mit Radioisotopen. Dies bringt allerdings den großen Nachteil mit sich, dass hierbei mit der ionisierten Strahlung der Radionuklide gearbeitet werden müsste. Dies bedeutet einen größeren Aufwand bei der Durchführung der Experimente und die Gefahr der möglichen Exposition der Mitarbeiter mit radioaktiver Strahlung.

In dieser Arbeit sollte eine einfache und sichere Methode angewendet werden, in der die neu eingeführten Halogensubstituenten als eine Sonde für die Liganden fungieren. Dabei soll sich der HR-CS AAS für die Quantifizierung der Metalle und der HR-CS MAS für die Gehaltsbestimmung der Halogene bedient werden. Für die Mehrfachvermessung derselben Proben muss nicht die instrumentelle Technik gewechselt werden, dies ist zusätzlich vorteilhaft für die experimentelle Durchführung und Probenvorbereitung. Aus den Quantifizierungen des Metalls und der Liganden können Rückschlüsse auf die Stabilität und den Aufnahmemechanismus der Komplexe gezogen werden, da der Goldgehalt mit den Mengen an Halogen verglichen werden kann. Für weitere Stabilitätsstudien sollen HPLC-MS und photometrische Methoden herangezogen werden.

Daraus leiten sich die folgenden Kernfragen dieser Arbeit ab:

Welchen Einfluss hat

- die Änderung der Größe des NHC-Grundkörpers

- die Einführung der Halogene Brom und Fluor gegenüber einem Wasserstoffsubstituenten

auf die Ergebnisse der biologischen Testung und Bioverteilung bei den unterschiedlichen Komplexstrukturen mit den allgemeinen Formeln „NHC-Au-Cl“ und „[NHC-Au-NHC]⁺ I⁻“?

Welche Aussagen können über

- die Zellaufnahme
- die Bioverteilung
- die Stabilität

der Komplexe getroffen werden, wenn man die einzelnen Teilstrukturen einzeln verfolgt und betrachtet?

3 Entwicklung neuer metallorganischer Gold(I)komplexe mit NHC Liganden

3.1 Strukturdesign der neuen NHC Gold(I)komplexe

Die Grundlage für das Strukturdesign der neuen Verbindungen dieses Projekts beruht auf Substanzen aus der Arbeit von Rubbiani et al. [144, 274]. Die dort entwickelten Gold(I) NHC Komplexe basieren wiederum auf den Leitstrukturen und biologischen Daten des bereits als DMARD (Disease Modifying Antirheumatic Drug) etablierten Arzneistoffs Auranofin (INN: Ridaura®) und GoPI von Deponte et al. [281]. Bei Auranofin und GoPI handelt es sich um Gold(I)komplexe mit Phosphanliganden. Sie zeigen gute antiproliferative Effekte bei verschiedenen Krebszelllinien und eine gute bis sehr gute Inhibition von disulfidspaltenden Reduktasen, wie der Thioredoxinreduktase oder Glutathionreduktase. Die Affinität dieser Komplexe zu den schwefel- und selenhaltigen Aminosäuren der Proteine wird durch das Konzept der „Hard and Soft Acids and Bases“ (HSAB) charakterisiert. Gold, als weiche Säure, reagiert leicht mit weichen Basen, wie dem Selenocystein im aktiven Zentrum der Thioredoxinreduktase, und mit etwas schwächerer Affinität auch mit Cysteinen im katalytischen Zentrum der Glutathionreduktase. Beides sind wichtige Enzyme im Redoxsystem der Zelle und schützen diese vor oxidativem Stress und Apoptose.

Die mono-NHC Komplexe (NHC-Au-Cl) von Rubbiani et al. [274] umfassen eine Gruppe von vier Verbindungen. Die linearen Metallkomplexe enthalten jeweils einen NHC- (Benzimidazol) und einen Chloridoliganden und sind somit ungeladen. Die Stickstoffe des Aromaten wurden unterschiedlich symmetrisch alkyliert (Abb. 27).

Die Reihe zeigte im Zytotoxizitätsassay IC_{50} Werte zwischen 6,4 – 13,3 μM bei HT-29 Zellen (humane Kolonkarzinomzellen) und 4,6 – 10,3 μM bei MCF-7 Zellen (humane Brustkrebszellen). Die aktivste Substanz der Serie trägt Ethylketten an den Stickstoffen. Weitere Testungen bezüglich der Inhibition des Enzyms TrxR zeigten, dass die IC_{50} Werte

zwischen 0,36 – 0,47 μM liegen. Auch hier stellte sich das ethylierte Derivat das aktivste dar. Aufgrund dieser Eigenschaften wurde für alle Verbindungen dieser Arbeit das Strukturelement der Ethylketten beibehalten. [274] Die zweite darauf aufbauende Serie von Rubbiani et al. [144] beinhaltet einen bis-NHC Gold(I)komplex. Bei der potentesten Verbindung der vorherigen Serie wurde der Chloridoligand gegen einen weiteren NHC-Liganden ausgetauscht, wodurch ein positiv geladener Komplex mit einem Iod als Gegenion entstand. Diese Verbindung zeigte zwar deutlich bessere antiproliferative Eigenschaften mit IC_{50} Werten bei 0,44 μM (HT-29 Zellen) und 0,81 μM (MCF-7 Zellen), aber eine schlechtere Hemmung der TrxR mit einer halbmaximalen inhibitorischen Konzentration von 4,89 μM . [144]

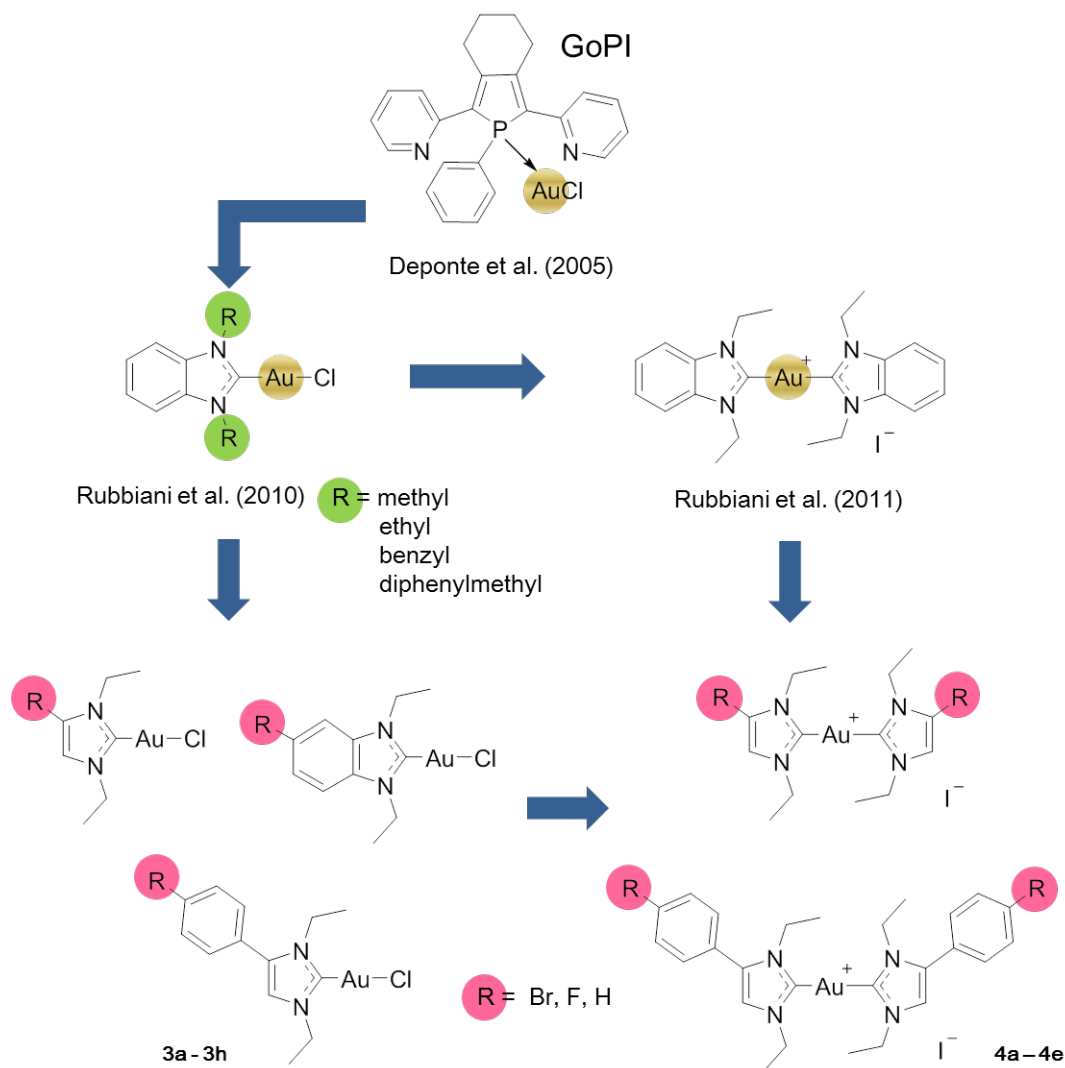


Abb. 26: Strukturdesign der neuen Komplexe 3a – 3h und 4a – 4e dieser Arbeit

Für die Weiterentwicklung der Komplexe wurde für diese Arbeit das Grundgerüst des *N*-heterozyklischen Carbens bezüglich seiner Größe variiert und Halogene bei allen drei NHC-Grundkörpern eingeführt. Um einen kleineren Grundkörper zu erhalten wurden Imidazole eingeführt, für einen größeren Grundkörper Phenylimidazole (Abb. 27 3a – 3h).

Aufgrund der biologischen Daten der ersten Serie dieser Arbeit wurde für die zweite Serie der bis-NHC Komplexe jeweils der potenteste Grundkörper und der am wenigsten potente Grundkörper aus der ersten Serie mit allen möglichen Halogenvariationen ausgewählt und daraus die entsprechenden Gold(I)komplexe synthetisiert und in der biologischen Testung gegenübergestellt (Abb. 27 4a – 4e).

3.2 Synthesewege

Die Synthese der beiden Serien von Gold(I) NHC-Komplexen erfolgte basierend auf der Grundlage von bekannten Vorschriften (Abb. 28). [144, 274, 282–284]

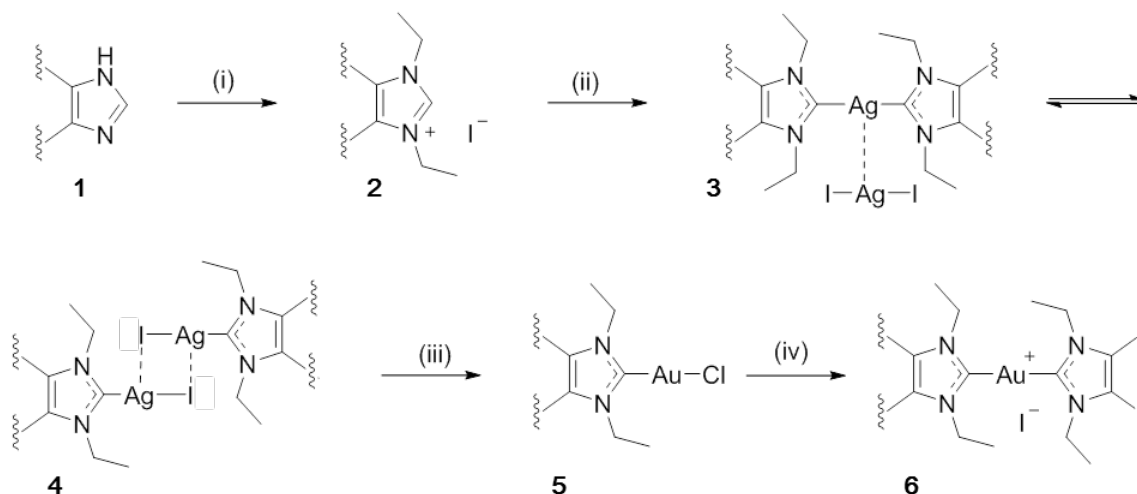


Abb. 27: Übersicht über die Synthesewegschritte und Endprodukte der aufeinander aufbauenden Serien

Durch die Modifikation der Äquivalente und Reaktionszeiten gelang es die Ausbeuten für die mono- und bis-NHC Gold(I)komplexe (5 und 6) deutlich zu verbessern. (Tab. 3)

Schritt	Reagenzien	Bedingungen	Lösemittel	Zeit	Ausbeuten (neu)	Ausbeuten (alt)
(i)	3,0 Äq C ₂ H ₅ -I 1,5 Äq K ₂ CO ₃	Rückfluss 98 °C	ACN	1 Tag (Im/Belm) 21 Tage (PhIm)	46 – 84 %	90 %
(ii)	0,55 Äq Ag ₂ O	Lichtschutz RT	DCM	2 Stunden	78 – 88 %	30 %
(iii)	1,1 Äq (CH ₃) ₂ SAuCl			10 Tage		
(iv)	1,0 Äq Ligand 2 1,5 Äq K ₂ CO ₃	Lichtschutz RT	DCM/MeOH [1:1]	14 Tage	66 – 86 %	43 %

Tab. 3: Reaktionsbedingungen der verschiedenen Syntheseschritte und die Gegenüberstellung der alten und neuen Ausbeuten, Im = Imidazole, Belm = Benzimidazole, PhIm = Phenylimidazole

Für die Synthese wurde mit den neutralen Imidazolen, Benzimidazolen bzw. Phenylimidazolen 1 gestartet. Die *N,N'*-Dialkylierung der Stickstoffe (i) erfolgte unter Rückfluss mit Ethyliodid unter Zusatz einer schwachen Base in Acetonitril (98 °C) und ergab die kationischen (Benz)Imidazoliumiodide 2. Die optimale Reaktionszeit war hierbei stark

vom Liganden abhängig. Imidazoliumiodide und Benzimidazoliumiodide konnten in 24 Stunden komplett umgesetzt werden. Bei den Phenylimidazoliumiodiden konnten nach einer Woche nur die einfach *N*-alkylierten Zwischenstufen isoliert werden. Erst nach einer Reaktionsdauer von drei Wochen konnten die gewünschten zweifach ethylierten Phenylimidazoliumiodide in ausreichender Reinheit und mit guten Ausbeuten erhalten werden. Der Reaktionsverlauf wurde stets mit Hilfe der DC verfolgt. Die Ausbeuten lagen zwischen 46 – 84 %.

Die Komplexierungsreaktion dieser Liganden **2** wurde in einer Eintopfreaktion durchgeführt. Unter Lichtausschluss fand eine zweistündige Metallierung unter Zugabe von Silberoxid statt (ii). Das Silberoxid fungiert hierbei als Katalysator zur Deprotonierung des C2-Kohlenstoffs und Erzeugung des Carbens unter Abspaltung von Wasser. Dabei entsteht ein nicht isolierbares Silberintermediat. Das Dimer wird in einer von Lin und Ghosh postulierten Gleichgewichtsreaktion beschrieben, in der die Strukturen $[\text{NHC-Ag-NHC}]^+ \cdot \text{AgI}_2^-$ **3** und $\{\text{NHC-Ag-I}\}_2$ **4** nebeneinander vorliegen [282, 283].

Das Intermediat wird direkt nach Zusatz von Chlorido(dimethylsulfid)gold(I) einer Transmetallierungsreaktion unterzogen, wobei Silberiodid als weißer Niederschlag ausfällt (iii). Die Produkte dieser Reaktion sind die gewünschten mono-NHC Gold(I)komplexe mit der allgemeinen Formel NHC-Au-Cl **5**. Nach der Aufreinigung über eine Celite® Säule konnten die reinen Produkte mit Ausbeuten von 78 – 88 % isoliert werden. Der Chloridoligand wurde durch massenspektroskopische Messungen, als auch durch die Elementaranalyse bestätigt. Für die Synthese der symmetrischen bis-NHC Komplexe **6** wurde der jeweilige mono-NHC Komplex **5** mit dem entsprechenden Liganden **2** unter Zusatz von Kaliumcarbonat, als milde Base, in einer Mischung von DCM/MeOH [1:1 v/v] über mehrere Tage umgesetzt (iv). Die Reaktionen brachten nach einer Reaktionsdauer von 14 Tagen und anschließender Aufreinigung Ausbeuten von 66 – 86 %.

Die detaillierten Syntheseprotokolle der einzelnen Verbindungen sind unter den allgemeinen Synthesevorschriften zu finden (Kapitel 8.3).

3.3 Reaktionsverfolgung und Besonderheiten der NMR Spektren

Im folgenden Abschnitt werden die verschiedenen erfolgreichen Syntheseschritte, wie im Syntheschema (Abb. 28) beschrieben, am Beispiel von NMR Spektren der „a-Serie“ (fluoriertes Phenylimidazol) dargestellt. Diese Reihe ist hierbei besonders interessant, da ausgehend vom Fluor (^{19}F Isotop, relative Häufigkeit: ~100 %) Kopplungen über mehrere Bindungen zum Kohlenstoff (^{13}C Isotop, relative Häufigkeit: 1,1 %) als auch zu den Protonen (^1H , relative Häufigkeit: ~99 %) auftreten und gemessen werden können. Dies beruht auf der Tatsache, dass alle Kerne der genannten Elemente einen Spin von $\frac{1}{2}$ aufweisen. Durch die charakteristischen Kopplungskonstanten kann jedes Atom im Molekül den Signalen aus den Spektren sehr genau zugeordnet werden. [34]

Allgemeine Beobachtungen und Besonderheiten bei allen anderen Substanzen sind in den nächsten Abschnitten ebenfalls beschrieben und zusammengefasst.

3.3.1 ^1H NMR Spektroskopie

3.3.1.1 (Benz)Imidazole und *N,N'*-Dialkylierungsreaktion

Im ^1H Spektrum des Phenylimidazols **1a** ist bei 9.86 ppm das sehr breite Singulett des Amidin-Protons an Position 1 zu finden. Es ist keine Aufspaltung von Signalen zu erkennen, da sich die Protonen der NH-Gruppen im ständigen intermolekularen Austausch befinden. Somit sind die Kopplungen von zu kurzer Dauer, als dass sie im NMR Spektrum zu erkennen wären. Die Beobachtung, dass eine große Austauschgeschwindigkeit zu einer Peakverbreiterung führt, konnte auch hier bestätigt werden (Abb. 29; lachsfarben).

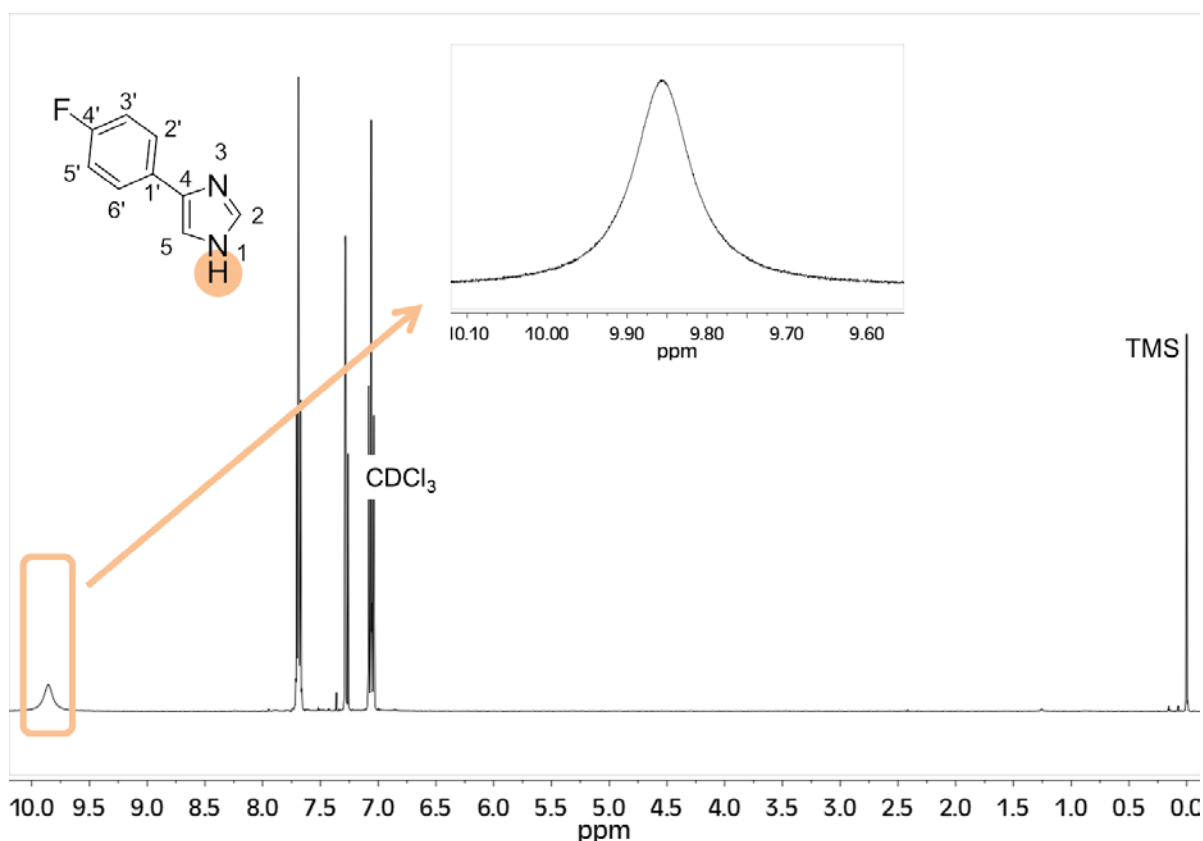


Abb. 28: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_7) Spektrum der fluorierten Phenylimidazols **1a**

Das austauschbare Proton der Amidgruppe (lachsfarben) ergibt ein charakteristisches breites Singulett.

Die Alkylierung der beiden Stickstoffe von **1a** geht mit einer Tieffeldverschiebung von 2.7 ppm für das Im-H2 Proton und 0.2 ppm für die beiden aromatischen Protonen in ortho-Position zum Fluor einher. Die beiden aromatischen Protonen in meta-Position zum Fluor werden hingegen um 0.2 ppm hochfeldverschoben. Zusätzlich erkennt man die erfolgreiche Umsetzung der Verbindungen an den neuen Signalen mit der Aufspaltung der CH_3 - und CH_2 -Gruppen der Ethylreste im hohen Feld. (Abb. 30; rosé) Die Protonen der Alkylketten sind damit bei den Verbindungen **2a** – **2d** und **2f** – **2g** nicht chemisch äquivalent. Bei den achsensymmetrischen (nicht halogenierten) Liganden des Benzimidazoltyps **2e** und Imidazoltyps **2h** ist diese Aufspaltung nicht zu beobachten.

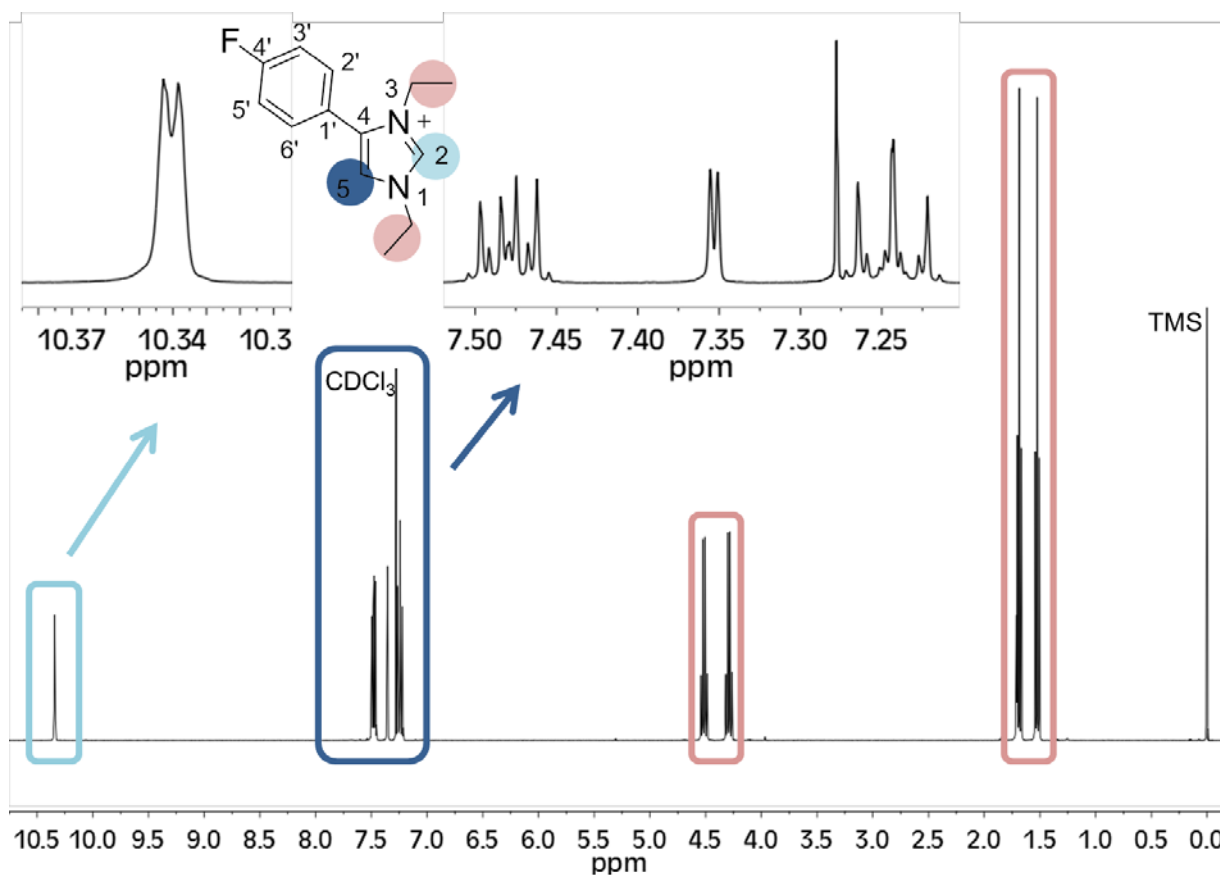


Abb. 29: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_7) Spektrum des fluorierten Phenylimidazols **2a**

Das Proton an Position 2 des Imidazolrings bei 10.34 ppm (hellblau) koppelt mit dem Proton an Position 5 (dunkelblau) bei 7.35 ppm mit einer Kopplungskonstante von 1.9 Hz über vier Bindungen.

3.3.1.2 (Benz)Imidazoliumiodide und die Komplexierungsreaktion

Eine erfolgreiche Metallierungs-/Transmetallierungsreaktion (siehe Synthesevorschrift **c**) konnte bei jeder Verbindung über NMR nachgewiesen werden.

Im ^1H Spektrum der (Benz)Imidazoliumiodide **2a** - **2h** verschwindet nach der erfolgreichen Umsetzung das Signal für das Proton am Carbenkohlenstoff (C2) bei ca. 10 ppm (Abb. 31, hellblau).

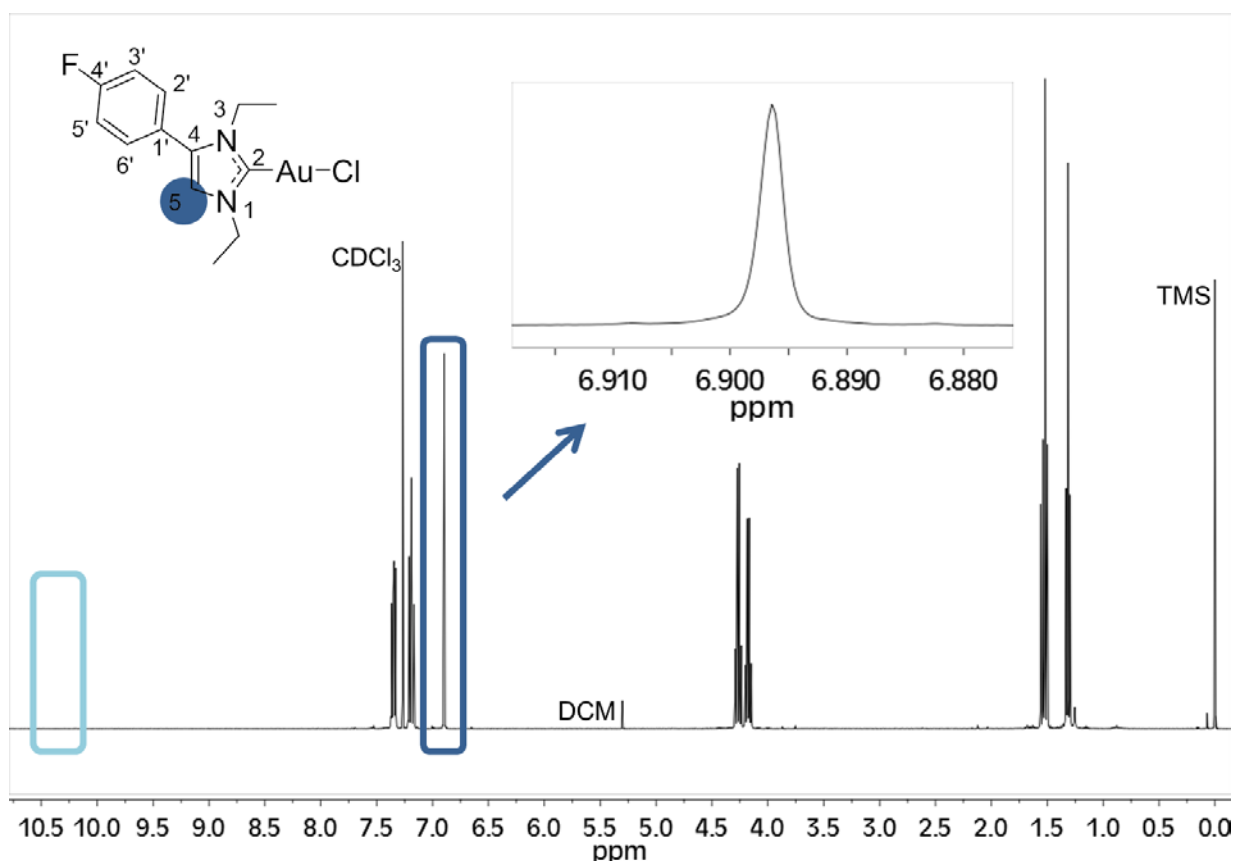


Abb. 30: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_7) Spektrum des fluorierten mono-NHC-Gold(I) Komplexes **3a**

Das Signal des Protons an Position C2 bei 10.34 ppm von Ligand **2a** verschwindet nach der erfolgreichen Umsetzung zum mono-NHC Gold(I) Komplex **3a**. Statt dem Dublett des Protons an C5 tritt dafür ein hochfeldverschobenes Singulett bei 6.90 ppm auf.

Des Weiteren entfällt die Kopplung zwischen den Protonen an Position C2 und C5 über vier Bindungen bei allen Imidazolgrundkörpern **3a** - **3e**. Statt der jeweiligen Dubletts (Abb. 30; hellblau und dunkelblau) ist ein einzelnes Singulett bei ca. 7 ppm zu erkennen (Abb. 31; dunkelblau), welches im Vergleich zu den entsprechenden Liganden um 0.40 – 0.70 ppm hochfeldschoben auftritt. Bei allen anderen Protonensignalen der verschiedenen Komplexe ist eine Abschirmung in Form einer Hochfeldverschiebung von bis zu 0.45 ppm zu vermerken. Eine Signalaufspaltung der Ethylketten ist bei den Komplexen **3a** – **3d** und **3f** – **3g** zu erkennen. Entsprechend der Vorstufen sind die Komplexe **3e** und **3h** symmetrisch und die Atome ihrer Ethylketten chemisch äquivalent.

3.3.1.3 Mono-NHC Gold(I)komplexe und die Ligandenaustauschreaktion

Der Vergleich der Protonenspektren von den mono- und den entsprechenden bis-NHC Gold(I)komplexen konnte keine signifikanten Verschiebungen aufzeigen. Die NMR Auswertung für sich ergab keine ausreichende Bestätigung für die tatsächliche Umsetzung der Komplexe, da die beiden NHC-Liganden des bis-Komplexes im Vergleich zu dem NHC-Liganden im mono-Komplex eine identische chemische Verschiebung und Signalaufspaltung aufwiesen. Den Integralen müssten also die doppelte Anzahl an Protonen im Vergleich zu den Spektren der mono-NHC Komplexe zugerechnet werden. Eine erfolgreiche Umsetzung zu den positiv geladenen bis-Komplexen konnte dennoch durch die zusätzliche Analytik von Dünnschichtchromatographie während der Synthese, anschließender Elementaranalyse und HPLC-MS/ESI der aufgereinigten Verbindungen überprüft und bestätigt werden.

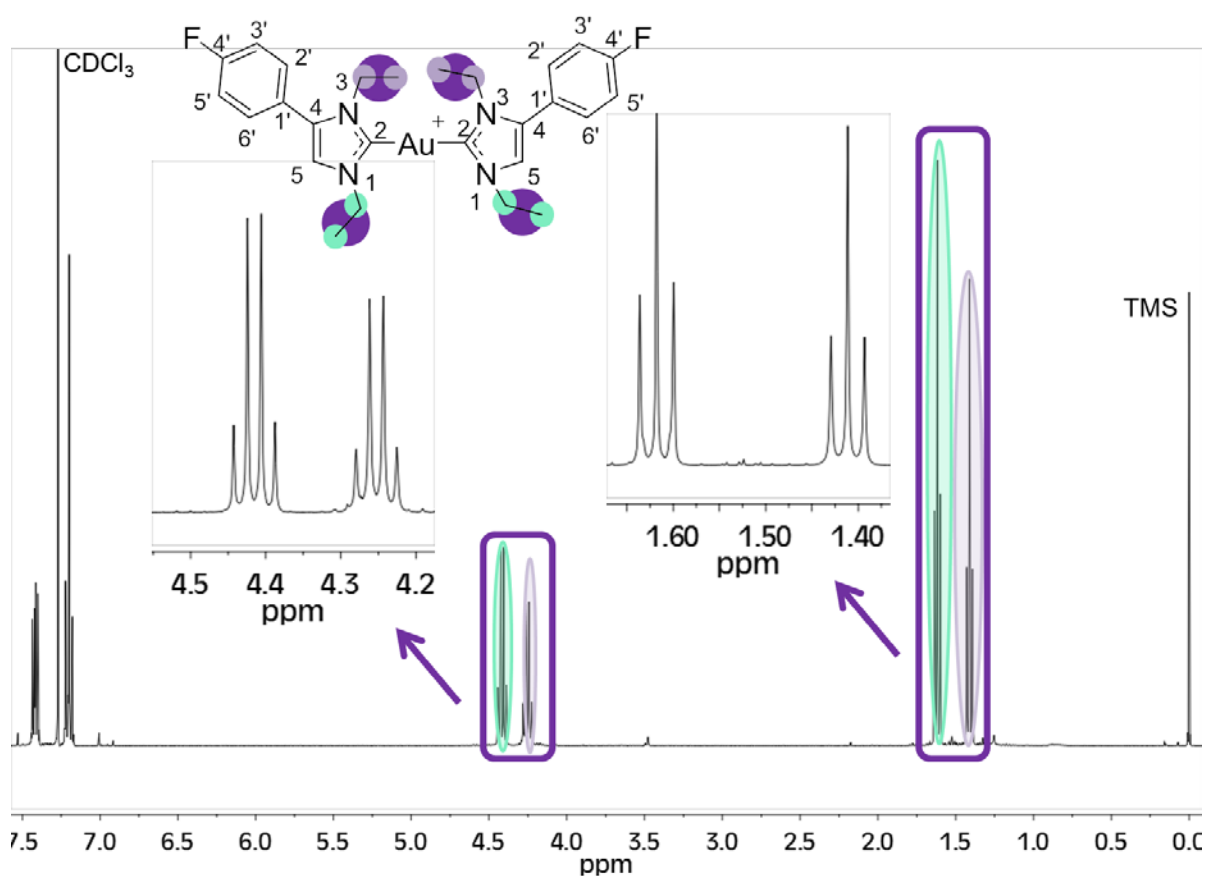


Abb. 31: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_7) Spektrum des fluorierten bis-NHC Gold(I) Komplexes 4a.

Eine Signalaufspaltung der beiden Ethylketten konnte, bis auf bei dem symmetrischen bis-Komplex **4e**, in allen weiteren Fällen beobachtet werden. Die Spektren der vier Ethylketten (Abb. 32; violett) spalten sich hierbei in jeweils zwei Signale für die CH₂- und CH₃-Gruppen auf (Abb. 32; mint/flieder), da diese chemisch nicht äquivalent sind. Eine eindeutige Zuordnung dieser Signale ist hierbei nicht möglich gewesen. Die Farbkodierungen in der Abb. 32 zeigen zur Verdeutlichung des Sachverhalts nur eine mögliche Variante.

3.3.2 ¹³C NMR Spektroskopie

3.3.2.1 (Benz)Imidazole und *N,N'*-Dialkylierungsreaktion

Als Besonderheit bei dem fluorierten Phenylimidazol **1a** und Benzimidazol **1f** sind im Protonen-entkoppelten ¹³C Spektrum Dupletts durch die Kohlenstoff-Fluor-Kopplungen zu erkennen.

Die direkte Nachbarschaft zum Fluorsubstituenten spiegelt sich in der großen Kopplungskonstante von 245.9 Hz wieder. Des Weiteren konnten folgende Dupletts über die charakteristischen Kopplungskonstanten den Kohlenstoffen des benachbarten aromatischen Rings zugeordnet werden, hier die Beispiele für die Verbindung **1a** mit ¹J_{C,F} = 245.9 Hz (162.0 ppm), ⁴J_{C,F} = 3.3 Hz (129.4 ppm), ³J_{C,F} = 8.0 Hz (126.6 ppm) und ²J_{C,F} = 21.1 Hz (115.6 ppm).

Die quartären Kohlenstoffe geben durch ihre lange Relaxationszeit im Vergleich zu tertiären, sekundären oder primären Kohlenstoffen insgesamt sehr kleine Signalintensitäten. Sie konnten ebenfalls dadurch identifiziert werden, dass sie nicht im Breitband-entkoppelten DEPT 135 Spektrum zu sehen sind. Durch die Entkopplung können die Kohlenstoffe vereinfacht als Singulett betrachtet werden und führen durch den Verzicht der Aufspaltung zu einer verbesserten Signalintensität, solange sie nicht mit anderen magnetisch aktiven Kernen des gleichen Spins, wie z.B. ¹⁹F, interagieren. [285]

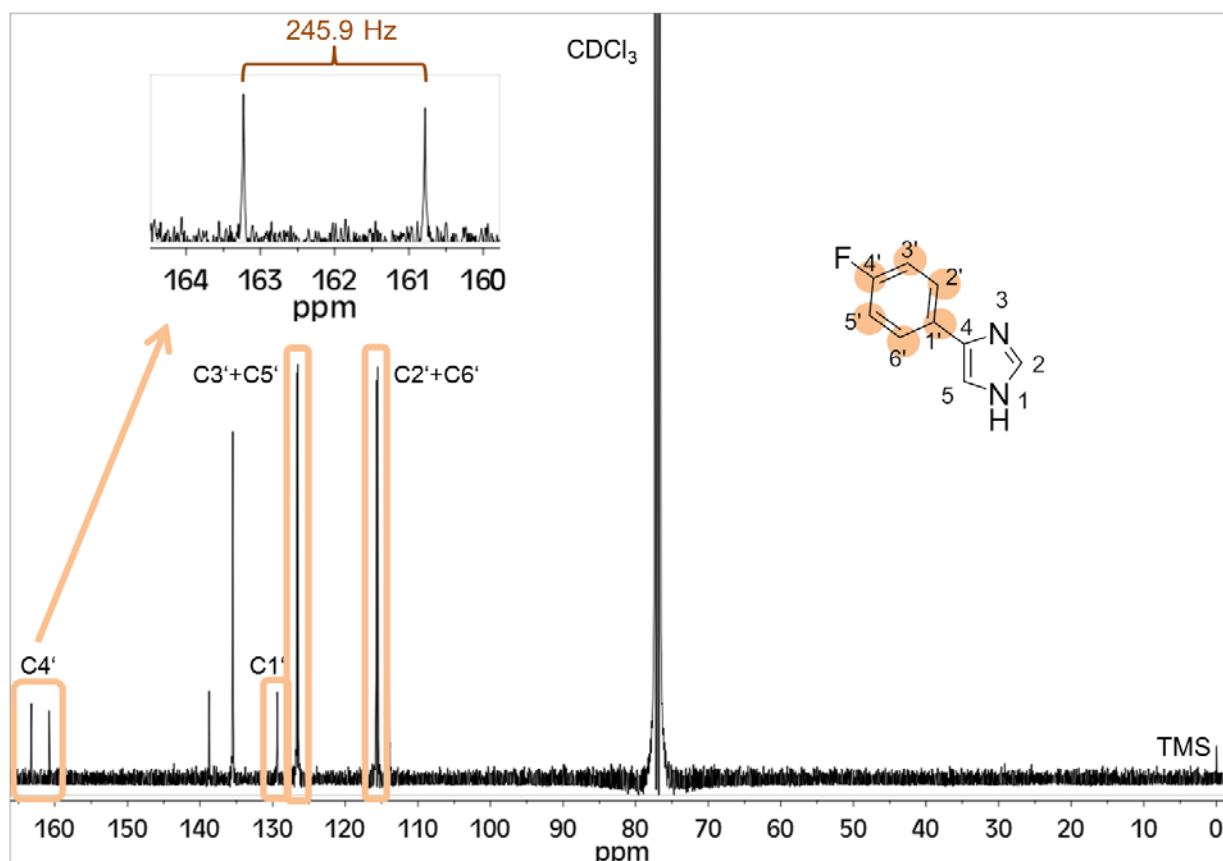


Abb. 32: ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_7) Spektrum des fluorierten Phenylimidazols 1a

Die vier Dubletts (lachsfarben) entstehen durch die Kopplung der Kohlenstoffe mit dem Fluor an Position 4'. Für die Kohlenstoffe mit einer Entfernung von zwei und drei Bindungen sind doppelte Signalintensitäten zu erkennen unter denen jeweils zwei Kohlenstoffe liegen. Die Größe der Kopplungskonstanten spiegelt sich in der Entfernung vom Fluor wieder.

Nach der zweifachen Ethylierung ist die erfolgreiche Umsetzung zum (Benz)Imidazoliumiodid an den vier neuen Signalen zu erkennen (Abb. 34; pink). Die primären Kohlenstoffe liegen im Spektrum als Singulett bei 15.5 und 15.7 ppm (im DEPT 135 mit positiver Signalphase), die beiden sekundären Kohlenstoffe kommen bei 43.3 und 45.6 ppm (im DEPT 135 mit negativer Signalphase). Entsprechend der Aufspaltung im ^1H Spektrum sind die beiden Ethylgruppen nicht chemisch äquivalent. In der chemischen Verschiebung ist für die Kohlenstoffe C4 und C1' eine Hochfeldverschiebung von 4 - 9 ppm (Abb. 34; hellblau), für alle anderen Kohlenstoffe eine Tieffeldverschiebung von 1 - 5 ppm zu vermerken (Abb. 34; gelb).

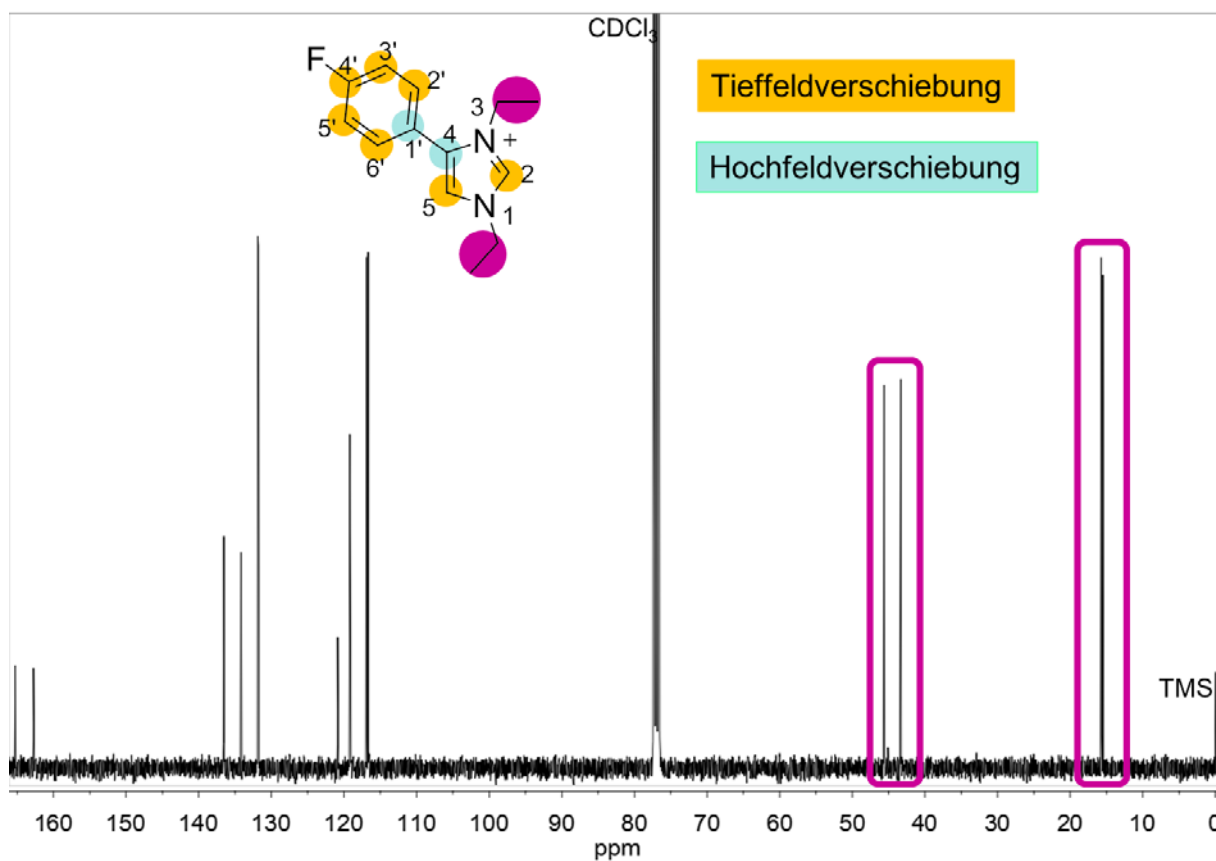


Abb. 33: ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_7) Spektrum des fluorierten Phenylimidazols **2a**

3.3.2.2 (Benz)Imidazoliumiodide und Komplexierungsreaktion

Nach der Komplexierung an das Goldzentralatom wurden die Carbenkohlenstoffe an Position C2 bei den Imidazolverbindungen um 34 ppm (Abb. 35; grün) und bei den Benzimidazolderivaten um 36 ppm ins tiefe Feld verschoben. Diese charakteristischen Entschirmungen gelten als maßgeblicher Hinweis für die erfolgreiche Umsetzung mit dem Metall.

Bei den Komplexen **3a** und **3f** konnten alle Kohlenstoff-Fluor-Kopplungen über vier Bindungen eindeutig identifiziert und zugeordnet werden. In den Verbindungen **3a** – **3h** zeigten alle restlichen Kohlenstoffatome keine signifikanten Änderungen in ihrer chemischen Verschiebung.

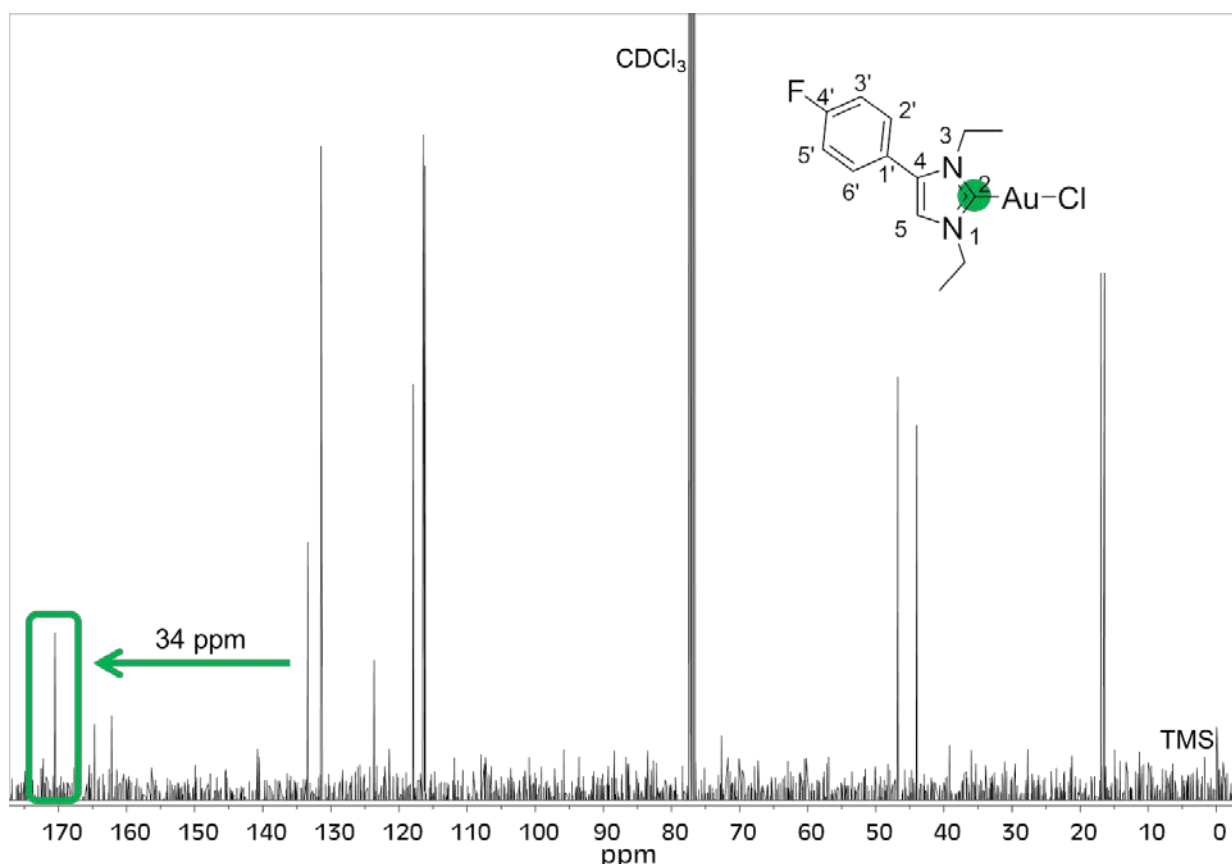


Abb. 34: ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3-d_7) Spektrum des fluorierten mono-NHC Gold(I) Komplexes **3a**

Die charakteristische Hochfeldverschiebung des Carbenkohlenstoffs um 34 ppm gilt als Bestätigung der erfolgreichen Synthese.

3.3.2.3 Mono-NHC Gold(I)komplexe und der Ligandenaustausch

Nach der Substitution des Chloridoliganden durch einen weiteren NHC-Liganden konnte bei allen Verbindungen eine weitere charakteristische Tieffeldverschiebung für die beiden jeweiligen Carbenkohlenstoffe C2 beobachtet werden. Diese liegen bei 13.0 ppm für die beiden halogenierten Phenylimidazolkomplexe **4a** und **4b**, bei 15.2 ppm für den nicht halogenierten Phenylimidazolkomplex **4c** und bei 12.5 ppm für die Imidazolderivate **4d** und **4e**. (Abb. 36; rostbraun)

Des Weiteren konnten für die Verbindung **4a** die charakteristischen Kohlenstoff-Fluor-Kopplungen über vier Bindungen eindeutig zugeordnet werden. Auch hier zeigten die

restlichen Kohlenstoffatome in allen Verbindungen **4a** – **4e** nach dem Ligandenaustausch keine signifikanten Änderungen in ihrer chemischen Verschiebung.

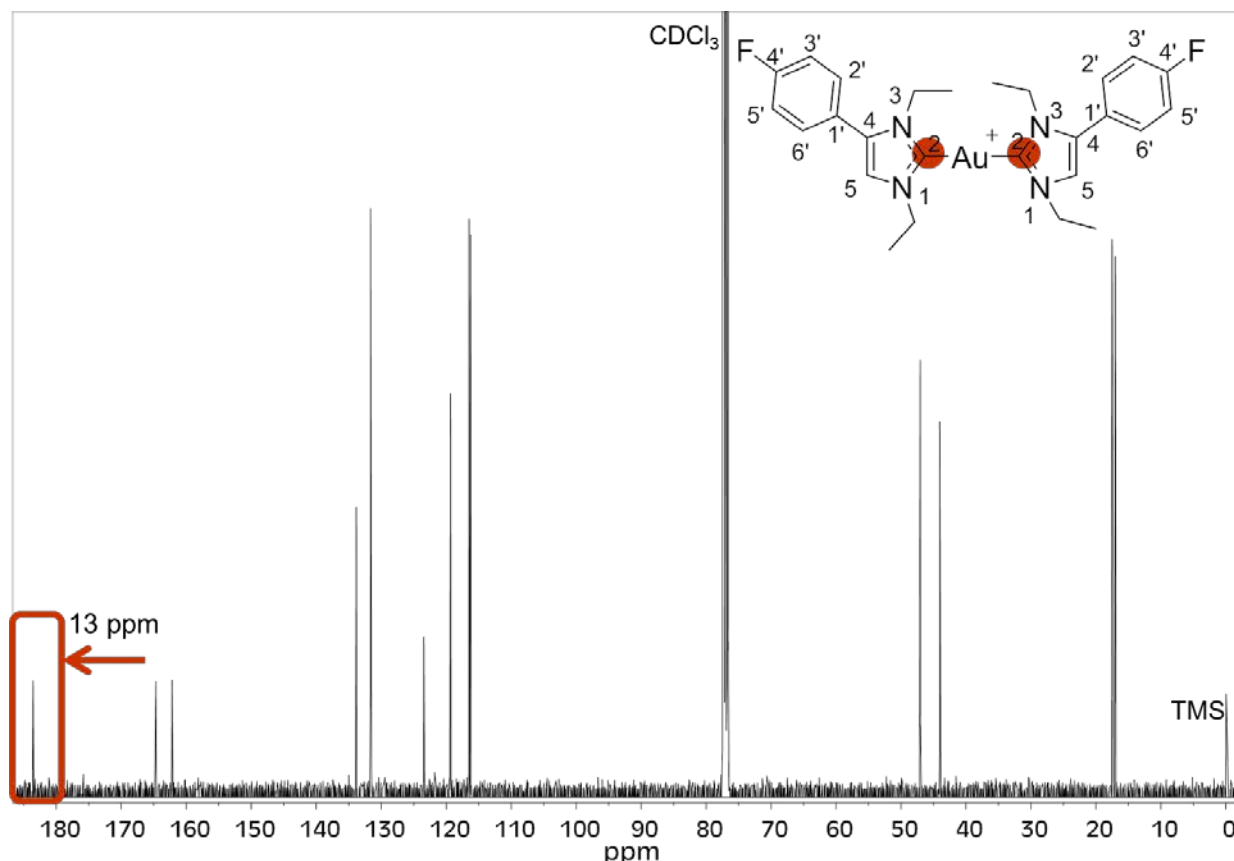


Abb. 35: ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_7) Spektrum des fluorierten bis-NHC Komplexes **4a**

Der charakteristische Upshift des Carbenkohlenstoffs um 13 ppm gilt als Bestätigung der erfolgreichen Synthese.

3.3.3 ^{19}F NMR Spektroskopie

Das Signal des Fluorsubstituenten des Phenylimidazols **1a** liegt bei -115.8 ppm. Durch die Alkylierung an den beiden Stickstoffen werden zwei elektronenschiebende Ethylketten mit positivem induktivem Effekt und dadurch eine positive Ladung am Stickstoff eingeführt. Dieser Effekt wirkt sich über eine Entschirmung aus, die sich in einer Tieffeldverschiebung um ca. 7 ppm widerspiegelt (**2a**). Die Komplexierung des NHC-Liganden an das Goldzentralatom führt wiederum zu einer leichten Hochfeldverschiebung auf -110.8 ppm, hierbei wird der Fluorkern mehr abgeschirmt. Ein weiterer Austausch des Chloridoliganden

gegen einen NHC-Liganden zeift keinen Einfluss auf die chemische Verschiebung des Fluorsubstituenten (Abb. 37).

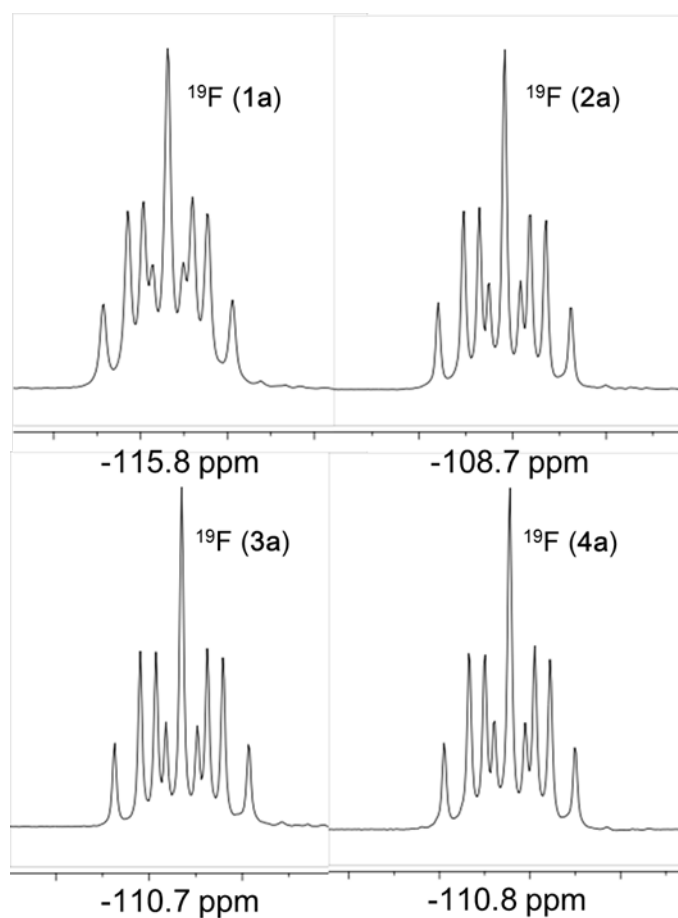


Abb. 36: ^{19}F Spektren der verschiedenen Substanzen der a-Reihe im Vergleich

3.4 Besonderheiten bei der massenspektrometrischen Charakterisierung

Die ungeladenen mono-NHC Gold(I)komplexe **3a – 3h** wurden mit MS-EI vermessen. Hierbei konnten die $[\text{M}]^+$ und $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ Peaks nachgewiesen werden. Für die geladenen (Benz)imidazoliumiodide **2a – 2h** und bis-NHC Gold(I)komplexe **4a – 4e** wurde die ESI-MS Technik verwendet. Auch hier konnten die Kationen als $[\text{M}-\text{I}]^+$ detektiert werden.

Als Besonderheit wurden bei den chlorhaltigen Verbindungen der mono-NHC Komplexe die entsprechenden Isotopenmuster für das Chlor, und bei allen bromhaltigen Verbindungen, die

des Broms, nachgewiesen. Brom als auch Chlor treten nicht monoisotopisch, sondern als Isotopengemische mit bestimmter Häufigkeit auf.

Beim Chlor beträgt die Häufigkeit für das Isotop ^{35}Cl 75,77 % und für das Isotop ^{37}Cl 24,23 %. Im Massenspektrum erkennt man bei der Anwesenheit eines Chlorsubstituenten die typische Signalaufspaltung von einem Doppelpeak, welcher mit einem Abstand von 2 Massenzahlen voneinander entfernt und einer Intensitätsverteilung von 3:1 auftritt. [285] Bei allen mono-NHC Gold(I)komplexen **3a** – **3h** konnte der Molekülpeak mit dieser Aufspaltung, neben dem Fragmentpeak mit den Massen $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ bestätigt werden.

Brom hat zwei Hauptisotope. ^{79}Br tritt mit einer Häufigkeit von 50,49 % und ^{81}Br mit einer Häufigkeit von 49,31 % auf. Auch bei den bromierten Komplexen ergibt sich daraus ein charakteristisches Aufspaltungsmuster, welches bei der Anwesenheit von einem Bromsubstituenten einen Doppelpeak mit dem Abstand von zwei Massenzahlen und einem Verhältnis von ca. 1:1 vorkommt (mono-NHC Komplexe **3b**, **3d** und **3g**). Bei zwei Substituenten im selben Molekül treten Dreiersignale mit dem Intensitätsverhältnis von ca. 1:2:1 auf. Auch hier liegen die Einzelsignale immer zwei Massenzahlen voneinander entfernt (**4b** und **4e**). [285]

Das Substitutionsmuster für Brom konnte im Molekülpeak $[\text{M}]^+$ und Fragmentpeak $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ bei allen bromierten Verbindungen der mono-NHC Komplexe und für zwei Bromsubstituenten in den Spektren der beiden Kationen $[\text{M}-\text{I}]^+$ der bis-NHC Komplexe bestätigt werden.

4 Gold(I) *N*-heterozyklische Carben Komplexe als potentielle Zytostatika

4.1 Zytotoxizitätsbestimmung mit dem Kristallviolettassay

In der Krebstherapie können verschiedene Strategien angewendet werden um einen Tumor zu bekämpfen. Die Zellen können im Wachstum gehemmt werden, die Blutversorgung und Gefäßneubildung kann unterbrochen werden oder die Zellen in die Apoptose geleitet werden.

Um die zytostatischen oder zytotoxischen Effekte von Substanzen zu untersuchen, werden meist kolorimetrische Verfahren herangezogen. Für diesen Zweck etablierte Methoden greifen auf Farbstoffe wie Methylenblau, Toluidinblau, Coomassie brilliant blue G, Neutralrot, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) oder Kristallviolett zurück. Die Färbemethoden beruhen auf verschiedenen Mechanismen. Das Neutralrot lagert sich in den Lysosomen von beschädigten Zellen ein, das MTT wird durch eine mitochondriale Dehydrogenase reduziert und das Kristallviolett bindet an das Chromatin und akkumuliert somit im Nukleus. [286–288] Toluidinblau zeigt eine große Affinität zu DNA und RNA, eine Bindung an diese Strukturen gibt eine blaue Farbe. [289] Das Coomassie brilliant blue G bindet an Zellproteine und ändert dabei seine Farbe in ein tiefes Blau (Abb. 38). [290] Für die Bestimmung der Zellzahl wird der Zellfarbstoff Kristallviolett eingesetzt, über welchen eine spektroskopische Quantifizierung durchgeführt werden kann.

Das zytotoxische Potential der verschiedenen Serien dieser Arbeit wurde ebenfalls mit der Kristallviolettgefärbung bestimmt. Diese Methode geht auf Gillies et al. [287] von 1986 zurück und wurde 1989 von Kueng et al. [291] und Bernhardt et al. [312] modifiziert und verbessert. Hierbei wachsen die Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 75 %. Wenn die Zellen über diese Konfluenz hinaus gezüchtet werden, gibt es keinen linearen Zusammenhang mehr zwischen der Zellzahl und der Absorption.

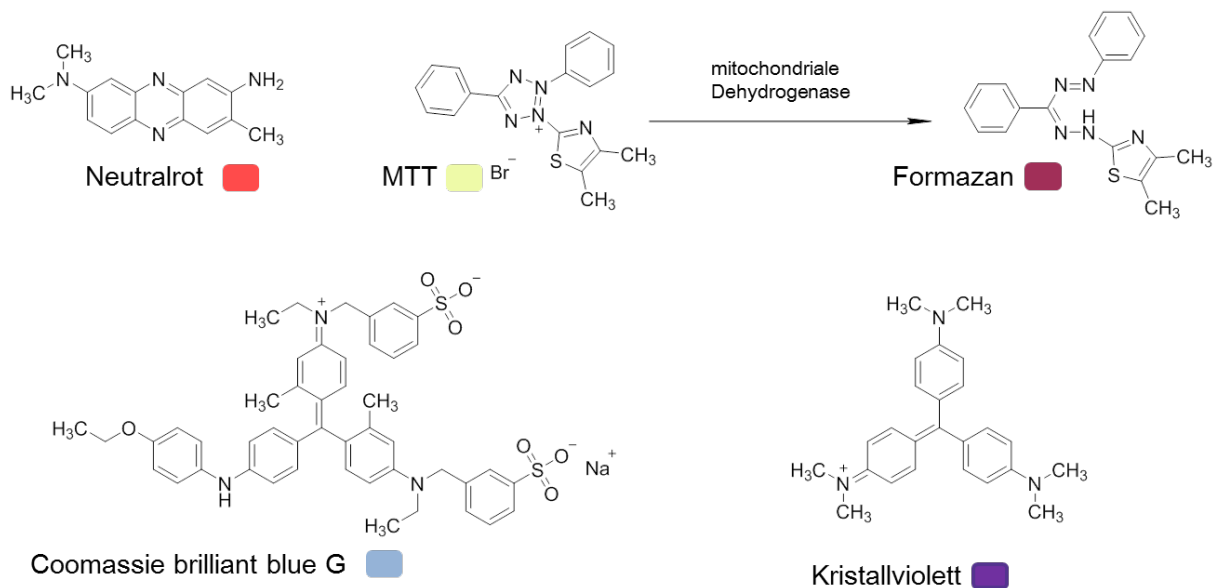


Abb. 37: Beispiele für Farbstoffe in der kolorimetrischen Quantifizierung der Zellzahl MTT, Formazan = 5-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan

Eine zu hohe Konfluenz bei der wiederholten Testung ist oft der Grund für stark schwankende Werte. [286] Weiterführend werden die Zellen mit den Testsubstanzen über einen festgelegten Inkubationszeitraum behandelt. Die abgestorbenen Zellen verändern ihre Morphologie und lösen sich vom Boden der Inkubationsgefäße ab. Nach der Inkubation wird das Medium mit den abgestorbenen Zellen abgesaugt. Dies ist notwendig, da das Kristallviolett unspezifisch in toten als auch lebenden Zellen akkumuliert. [286] Die verbleibenden lebenden Zellen werden mit Glutaraldehyd fixiert. Die Färbung wird mit einer wässrigen Kristallviolettlösung durchgeführt. Nach einer Einwirkzeit werden die Zellen gründlich mit Wasser gewaschen. Um für die photometrische Messung das Kristallviolett aus den Zellkernen herauszulösen, wird als Auszugsmittel Ethanol (70 % v/v) verwendet und die Proben anschließend photometrisch vermessen.

Bei der Auswertung wird die Biomasse der Kontrolle, welche nur mit dem entsprechenden Lösemittel inkubiert wurde, mit der Biomasse der Testverbindungen nach der Inkubation verglichen. Von der Absorption der Kontrolle und den verschiedenen Testkonzentrationen

wird jeweils die Absorption der Zellen zu Beginn des Testes abgezogen (t_0 -Wert). Das Wachstum der Kontrolle wird als 100 % angesetzt und davon ausgehend die Reduzierung der Biomasse jeder einzelnen Testkonzentration in Prozent bestimmt. Die Konzentration, welche die Reduzierung der Biomasse um 50 % bewirkt, wird als IC_{50} bezeichnet und wird zum Vergleich der verschiedenen Substanzen untereinander herangezogen.

Für den Zytotoxizitätstest wurden die synthetisierten Substanzen und Referenzen in HT-29 humane kolorektale Adenokarzinomzellen, MCF-7 (östrogenabhängig) und MDA-MB-231 (östrogenunabhängig) humane Brustadenokarzinomzellen und zum Vergleich auch in gesunden immortalisierten RC-124 Nierenzellen getestet. Die Lösungsmittel DMF oder Wasser sind dem DMSO vorzuziehen, da letzteres komplexieren und eine Ligandenaustauschreaktionen provozieren könnte [292]. Exemplarisch wurde für die Syntheserieihe **a**, welche die aktivsten Verbindungen dieser Arbeit enthält, auf mögliche Lösemitteleffekte getestet.

4.1.1 Phenylimidazol und (Benz)imidazoliumiodide

Das ungeladene fluorierte Phenylimidazol **1a** war in den höchsten Testkonzentrationen vor dem Verdünnen mit dem Zellkulturmedium von 100 – 300 mM nicht komplett in Wasser löslich. Daher wurden die Tests dieser Verbindung nur mit DMF- und DMSO-Stammlösungen mit durchgeführt. Für die Substanz **1a** konnte in keiner Zelllinie zellwachstumshemmende Effekte bis 300 μ M nachgewiesen werden.

Genauso verhält es sich bei dem kationischen Phenylimidazoliumiodid **2a**, welches eine gute Wasserlöslichkeit aufweist. Alle weiteren (Benz)imidazoliumiodide **2b** – **2h** wurden bis zu einer Endkonzentration von 100 μ M in DMF getestet. Es konnte auch hier kein Effekt auf das

Zellwachstum nachgewiesen werden. Alle Vorstufen und Liganden sind folglich inaktiv (Tab. 4).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	HT-29 IC ₅₀ [µM]	MCF-7 IC ₅₀ [µM]	MDA-MB-231 IC ₅₀ [µM]	RC-124 IC ₅₀ [µM]
Vorstufe	1a	DMF	> 300	> 300	> 300	> 300
Vorstufe	1a	DMSO	> 300	> 300	> 300	> 300
Vorstufe	1a	H ₂ O	n.l.	n.l.	n.l.	n.l.
Ligand	2a	DMF	> 300	> 300	> 300	> 300
Ligand	2a	DMSO	> 300	> 300	> 300	> 300
Ligand	2a	H ₂ O	> 300	> 300	> 300	> 300
Liganden	2b – 2h	DMF	> 100	> 100	> 100	> 100

Tab. 4: IC₅₀ Werte der Verbindungen 1a und 2a – 2h (n = 3), n.l. = nicht löslich in den benötigten Konzentrationen

4.1.2 Mono-NHC Gold(I)komplexe

Für die Serie der mono-NHC Gold(I)komplexe wurden IC₅₀ Werte zwischen 4 – 17 µM bestimmt. Die IC₅₀ Werte liegen in dieser Serie dicht beieinander, leichte Tendenzen bezüglich der Aktivitätsunterschiede sind zu erkennen. Verbindungen mit einem Imidazolgrundkörper (**3d – 3e**) zeigten Aktivitäten im Bereich von ca. 6 – 17 µM. Die Komplexe mit einem Benzimidazolliganden (**3f – 3h**) liegen bei ca. 5 – 12 µM und die Derivate mit den Phenylimidazolgrundkörper (**3a – 3c**) zeigen Aktivitäten bei ca. 5 – 8 µM. Exemplarisch wurde die Struktur **3a** unter Verwendung von DMF und DMSO als Stammlösung getestet, welche vor der Testung 1:1000 mit Zellkulturmedium verdünnt worden sind. Mit Wasser als Stammlösung konnte bei einer Konzentration von 50 mM keine vollständige Löslichkeit erreicht werden. Durchschnittlich konnte Verbindung **3a** 1,55-fach höhere Aktivitäten mit einer DMF-Stammlösung, im Vergleich zu der DMSO-Stammlösung, erzielen. Somit konnte ein sehr geringer Lösemiteleinfluss auf das wachstumshemmende Potential festgestellt werden (Tab. 5).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	HT-29 IC ₅₀ [μM]	MCF-7 IC ₅₀ [μM]	MDA-MB-231 IC ₅₀ [μM]	RC-124 IC ₅₀ [μM]
FPhIm-Au-Cl	3a	DMF	6,14 ^{+/-0,75}	5,05 ^{+/-0,67}	5,54 ^{+/-0,25}	4,62 ^{+/-0,25}
FPhIm-Au-Cl	3a	DMSO	9,24 ^{+/-0,70}	6,97 ^{+/-0,25}	8,22 ^{+/-1,19}	8,52 ^{+/-0,76}
FPhIm-Au-Cl	3a	H ₂ O	n.l.	n.l.	n.l.	n.l.
BrPhIm-Au-Cl	3b	DMF	6,23 ^{+/-0,57}	4,73 ^{+/-0,65}	7,20 ^{+/-0,45}	4,91 ^{+/-0,73}
HPhIm-Au-Cl	3c	DMF	6,80 ^{+/-0,98}	4,76 ^{+/-0,21}	8,13 ^{+/-0,60}	4,46 ^{+/-0,04}
BrIm-Au-Cl	3d	DMF	12,05 ^{+/-0,72}	6,52 ^{+/-0,47}	8,22 ^{+/-0,37}	5,49 ^{+/-0,32}
HIm-Au-Cl	3e	DMF	16,97 ^{+/-0,25}	11,25 ^{+/-1,09}	11,58 ^{+/-1,03}	10,58 ^{+/-0,69}
FBeIm-Au-Cl	3f	DMF	11,59 ^{+/-1,51}	9,05 ^{+/-1,88}	10,89 ^{+/-0,15}	8,84 ^{+/-0,33}
BrBeIm-Au-Cl	3g	DMF	11,71 ^{+/-0,41}	7,19 ^{+/-0,83}	9,00 ^{+/-0,69}	10,48 ^{+/-0,45}
HBeIm-Au-Cl	3h	DMF	11,15 ^{+/-0,71}	6,68 ^{+/-0,82}	9,18 ^{+/-0,50}	5,07 ^{+/-0,14}

Tab. 5: IC₅₀ Werte der Verbindungen (n = 4), n.l. = nicht löslich in den benötigten Konzentrationen

4.1.3 Bis-NHC Gold(I)komplexe

Bei der Entwicklung der Serie von bis-NHC Gold(I)komplexen **4a – 4e** wurden jeweils die schwächsten und stärksten mono-NHC Gold(I)komplexe **3a – 3e** mit den Imidazol- und Phenylimidazolgrundkörpern aus der vorherigen Serie ausgewählt und weiter zu den bis-NHC Gold(I)komplexen umgesetzt. Die daraus resultierenden größeren lipophilen kationischen Strukturen zeigen niedrigere IC₅₀ Werte im Vergleich zu den vorherigen mono-NHC Komplexen. Die Aktivitäten lagen durchschnittlich zwischen 0,05 – 6 μM. Die Komplexe mit einem Imidazolgrundkörper **4d – 4e** erreichten Konzentrationen um 0,72 – 6 μM und die Verbindungen mit einem Phenylimidazolgrundkörper **4a – 4c** lagen im Bereich von ca. 0,05 – 0,18 μM im DMF. Die Testung der Verbindung **4a** konnte ebenfalls aus einer DMSO-Stammlösung durchgeführt werden. Wie bereits bei der vorherigen Serie waren auch hier die

Werte mit einer DMF-Stammlösung 1,23-fach niedriger und die Verbindungen somit etwas aktiver (Tab. 6).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	HT-29 IC ₅₀ [μM]	MCF-7 IC ₅₀ [μM]	MDA-MB-231 IC ₅₀ [μM]	RC-124 IC ₅₀ [μM]
FPhIm-Au ⁺ -FPhIm I ⁻	4a	DMF	0,15 ^{+/-0,01}	0,10 ^{+/-0,02}	0,14 ^{+/-0,03}	0,05 ^{+/-0,00}
FPhIm-Au ⁺ -FPhIm I ⁻	4a	DMSO	0,23 ^{+/-0,00}	0,12 ^{+/-0,02}	0,14 ^{+/-0,04}	0,06 ^{+/-0,00}
FPhIm-Au ⁺ -FPhIm I ⁻	4a	H ₂ O	n.l.	n.l.	n.l.	n.l.
BrPhIm-Au ⁺ -BrPhIm I ⁻	4b	DMF	0,14 ^{+/-0,02}	0,06 ^{+/-0,00}	0,18 ^{+/-0,01}	0,05 ^{+/-0,01}
HPhIm-Au ⁺ -HPhIm I ⁻	4c	DMF	0,15 ^{+/-0,01}	0,16 ^{+/-0,03}	0,18 ^{+/-0,02}	0,09 ^{+/-0,02}
HIm-Au ⁺ -HIm ⁻	4e	DMF	5,54 ^{+/-0,79}	4,20 ^{+/-0,72}	5,08 ^{+/-0,60}	3,44 ^{+/-0,38}
Brlm-Au ⁺ -Brlm I ⁻	4d	DMF	1,51 ^{+/-0,10}	0,72 ^{+/-0,07}	1,08 ^{+/-0,06}	0,94 ^{+/-0,10}

Tab. 6: IC₅₀ Werte der Verbindungen (n = 4), n.l. = nicht löslich in den benötigten Konzentrationen

4.1.4 Goldhaltige Referenzen

Auranofin **R1** dient als antiproliferativ wirksame Leitstruktur von neuen Organometallkomplexen mit Gold als Zentralatom. Der Arzneistoff wurde deshalb als Referenz hinzugezogen. Eine weitere Vergleichsverbindung stellt das Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2** dar. Diese entspricht von der Struktur her dem Auranofin, wobei der 2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-1-thio-β-D-glucose-Rest gegen einen Chloridoliganden ausgetauscht wurde. Somit hat **R2** strukturell eine große Ähnlichkeit mit der Serie der mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** - **3h** (NHC-Au-Cl). Des Weiteren wurden die beiden anorganischen Goldsalze AuCl **R3** und AuCl₃ **R4** getestet. Diese stellen als „Bausteine“ der Komplexe den Gegenpart zu den bereits dargestellten isolierten (Benz)imidazoliumiodidliganden **2a** - **2h** dar.

Die Metallkomplexe Auranofin **R1** und Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2** zeigen Aktivitäten im unteren mikromolaren Bereich, wobei Auranofin **R1** 2- bis 3-mal aktiver ist als

das Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2**. Ein Austausch des Lösemittels DMF gegen DMSO in der Stammlösung konnte keine signifikanten Unterschiede hervorbringen. Beide Komplexe zeigten in Wasser bis zu Konzentrationen von 20 mM keine vollständige Löslichkeit und wurden daher nicht in diesem Lösemittel getestet (Abb. 7).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	HT-29 IC ₅₀ [µM]	MCF-7 IC ₅₀ [µM]	MDA-MB-231 IC ₅₀ [µM]	RC-124 IC ₅₀ [µM]
Auranofin	R1	DMF	3,79 ^{+/-0,18}	2,00 ^{+/-0,05}	1,54 ^{+/-0,12}	1,44 ^{+/-0,03}
Auranofin	R1	DMSO	3,61 ^{+/-0,06}	2,62 ^{+/-0,13}	2,03 ^{+/-0,59}	2,51 ^{+/-0,21}
Auranofin	R1	H ₂ O	n.l.	n.l.	n.l.	n.l.
Et ₃ PAu-Cl	R2	DMF	10,20 ^{+/-0,79}	3,93 ^{+/-0,27}	3,21 ^{+/-0,24}	6,72 ^{+/-0,44}
Et ₃ PAu-Cl	R2	DMSO	11,42 ^{+/-0,20}	8,53 ^{+/-0,66}	5,31 ^{+/-0,24}	3,65 ^{+/-0,65}
Et ₃ PAu-Cl	R2	H ₂ O	n.l.	n.l.	n.l.	n.l.
AuCl	R3	DMF	> 300	> 300	266,63 ^{+/-39,70}	> 300
AuCl	R3	DMSO	> 300	> 300	206,15 ^{+/-31,11}	> 300
AuCl	R3	H ₂ O	> 300	> 300	266,14 ^{+/-39,09}	> 300
AuCl ₃	R4	DMF	180,64 ^{+/-8,24}	119,04 ^{+/-19,06}	53,27 ^{+/-4,18}	50,59 ^{+/-26,33}
AuCl ₃	R4	DMSO	179,38 ^{+/-1,31}	118,87 ^{+/-1,77}	54,45 ^{+/-1,88}	82,58 ^{+/-28,21}
AuCl ₃	R4	H ₂ O	159,63 ^{+/-20,50}	91,81 ^{+/-11,58}	43,42 ^{+/-11,60}	66,68 ^{+/-19,58}

Tab. 7: IC₅₀ Werte der Verbindungen (n = 4), n.l. = nicht löslich in den benötigten Konzentrationen

Das Gold(I)chlorid **R3** hemmt nur in sehr hohen Konzentrationen (206 – 266 µM) das Wachstum der MDA-MB-231 Brustkarzinomzellen. Bei allen anderen getesteten Zelllinien zeigte diese Referenz bis zu einer Testkonzentration von 300 µM keine Wirkung. Das Lösemittel DMSO hat bei dem Goldsalz einen geringen positiven Effekt auf die Aktivität gegenüber DMF und Wasser. Die IC₅₀ Werte einer DMF-, und Wasser-Stammlösung sind im Vergleich zu DMSO 1,3-mal höher.

Das Gold(III)chlorid **R4** dagegen zeigt moderate Aktivitäten bei allen Zelllinien. Wie auch bei dem Gold(I)chlorid **R3**, zeigt es eine Präferenz gegenüber MDA-MB-231 und zusätzlich

gegenüber den gesunden RC-124 Nierenzellen. Hier liegen die IC_{50} Werte zwischen 44 – 55 μM (MDA-MB-231) und 51 – 83 μM (RC-124). Für die beiden anderen Zelllinien liegen die IC_{50} Werte im Bereich von 95 – 180 μM und werden somit als nur sehr schwach aktiv gewertet. Bis auf bei der Testung in RC-124 Zellen sind die IC_{50} Werte mit der Verwendung einer wässrigen Stammlösung geringer und damit die Aktivität um durchschnittlich das 1,2-Fache höher.

4.1.5 Zusammenfassung

Aus den Ergebnissen der mono-, als auch bis-NHC Reihe konnten Strukturwirkungsbeziehungen abgeleitet werden. In den Grafiken (Abb. 39 und Abb. 40) werden die Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Strukturen aufgeschlüsselt.

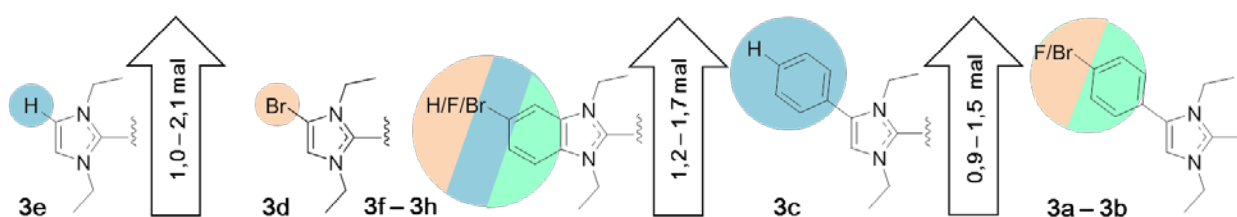


Abb. 38: Aktivitätssteigerungen der Serie mit der Grundstruktur NHC-Au-Cl entsprechend der Komplexe 3a – 3h abhängig von der Substitution oder Anellierung des Imidazolrings. Dargestellt sind nur die NHC-Liganden dieser Komplexe

Die schwächste Verbindung in der Serie der mono-NHC Gold(I)komplexe stellt der nicht halogenierte Imidazolkomplex **3e** dar. Die Aktivität konnte von diesem Liganden ausgehend je nach Zelllinie um das 1,0 - 2,1-Fache durch die Substitution von Brom an Position 4 des Grundkörpers von **3d** oder durch den Austausch gegen einen Benzimidazolgrundkörper mit unterschiedlichen Substitutionen wie bei **3f – 3h** (siehe Abb. 39) gesteigert werden. Eine Halogenierung des Benzimidazolliganden an Position 5 **3f/3g** konnte in beiden Fällen keine weitere Aktivitätssteigerung bewirken. Nach der Einführung eines nicht halogenierten

Phenylimidazolliganden **3c** wurde der antiproliferative Effekt im Vergleich zu den Benzimidazolkomplexen 1,2- bis 1,7-fach verstärkt. Eine 4'-Bromierung von **3b**, als auch eine 4'-Fluorierung zu **3a**, reduzierten die IC_{50} Werte bis zu 1,5-mal im Vergleich zu dem nicht halogenierten Pendant.

Die antiproliferativen Eigenschaften sind am geringsten, wenn der NHC-Grundkörper klein ist, wie die Ergebnisse der Imidazolverbindungen **3d/3e** beweisen. Die Phenylimidazolkomplexe **3a – 3c** mit den größten Grundkörpern stellen die aktivsten Verbindungen dieser Serie dar. Die Änderung der Grundkörper durch Substitution eines Halogens hat keine oder nur sehr geringe Aktivitätsunterschiede zur Folge. Eine Selektivität zwischen den tumorösen und gesunden Zellen konnte nicht nachgewiesen werden.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde eine weitere Serie von symmetrischen bis-NHC Gold(I)komplexen ($[NHC-Au-NHC]^+ I^-$) **4a – 4e** synthetisiert. Die Grundkörper der Imidazole und Phenylimidazole wurden ausgewählt, um zu untersuchen, ob sich der Trend bezüglich der Aktivitätsunterschiede auch bei dieser Serie bestätigen lässt.

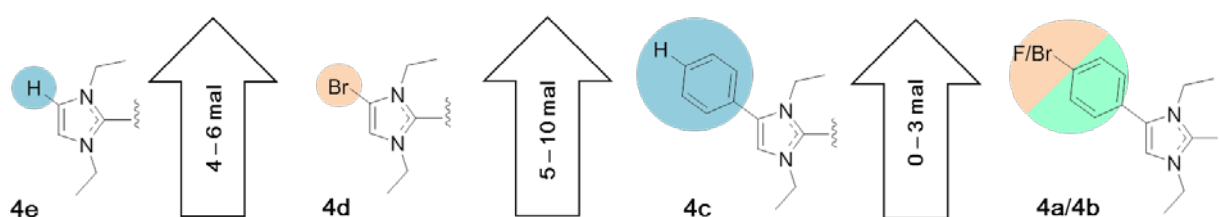


Abb. 39: Aktivitätssteigerungen der Serie mit der Grundstruktur $[NHC-Au-NHC]^+ I^-$ entsprechend der Komplexe **4a – 4e** abhängig von der Substitution des Imidazolrings an der Position 4

Auf die zusätzlichen Benzimidazolliganden wurde hierbei verzichtet, da sie zu dem bromierten Imidazolkomplex **3d** vergleichbare IC_{50} Werte zeigten und in nicht halogener Form bereits von Rubbiani et al. [144, 274] genauer untersucht worden ist. Der Austausch

des Chlorido-Liganden gegen einen weiteren NHC-Liganden führte zu einer Vergrößerung der Moleküle und der Einführung einer positiven Ladung. Dies spiegelte sich in vergleichsweise niedrigen IC_{50} Werten im unteren mikromolaren bis niedrigen nanomolaren Bereich (0,05 – 6 μ M) wieder. An den experimentellen Werten ist abzulesen, dass eine Änderung des Grundkörpers, als auch eine Halogensubstitution zu signifikanten Aktivitätsunterschieden bei dieser Serie führt. Die Aktivitätsreihenfolge der unterschiedlichen Ligandengrundkörpern und ihren Substitutionen ist in beiden Serien identisch. Auch hier sind die Komplexe mit Imidazolgrundkörper **4d** – **4e** weniger aktiv als die größeren Phenylimidazolgrundkörper **4a** – **4c**. Eine Aktivitätssteigerung konnte ebenfalls bei einer Halogenierung erreicht werden. Der unsubstituierte bis-NHC Gold(I)komplex mit Benzimidazolliganden von Rubbiani et al. [144] zeigt auf den Zelllinien HT-29 und MCF-7 IC_{50} Werte von 0,4 – 0,8 μ M. Somit ist dieser von den antiproliferativen Eigenschaften zwischen den Imidazol- und Phenylimidazolkomplexen dieser Arbeit anzusiedeln und folgt im Vergleich zum entsprechenden mono-NHC Gold(I)komplexen ebenfalls den beschriebenen Aktivitätstendenzen der Ligandengrundkörper (Abb. 40).

4.2 Bioverteilung

4.2.1 Etablierung einer MAS-Methode zur Quantifizierung von Fluor

Zur Quantifizierung des Fluors in biologischen Proben wurde eine modifizierte MAS-Methode nach Würtenberger et al. [271] angewendet. Diese Applikation bietet die geringsten Nachweisgrenzen in der Anwendung für die Vermessung von gebundenem Fluor an Metallkomplexe in Zellsuspensionen nach dem heutigen Stand der Forschung. Die Methode greift auf die Absorptionslinie des Galliummonofluorid bei 211,2480 nm zurück. Ionisches als auch organisch gebundenes Fluor kann aus dem Molekülverband freigesetzt werden und mit dem Molekülbildungsreagenz Galliumnitrat ein zweiatomiges Molekül bilden, welches dann als Galliummonofluorid (GaF) erfasst werden kann. Um generell Signale und dazu niedrige Detektionsgrenzen zu erhalten, ist ein gut aufeinander abgestimmtes Zusammenspiel aus einem geeigneten Molekülbildungsreagenz, zusätzlichen Modifiern und dem darauf abgestimmten Temperaturprogramm erforderlich.

Neben dem Molekülbildungsreagenz wurde bei dieser Methode als zusätzlicher Modifier eine Tantalfolie verwendet, mit der ein Standardgrafitrohr von Innen komplett ausgekleidet wurde. Es war besonders wichtig, dass die Folie millimetergenau angepasst wurde. Im Laufe der Etablierung dieser Methode in unserem Labor, stellte sich dieser Schritt als der entscheidende heraus, um eine gute Reproduktion der Messungen und gleichbleibend niedrige Blindwerte zu erreichen. Die Anwendung einer Metallfolie bietet im Vergleich zu anderen vielfach verwendeten Modifizierlösungen einige Vorteile. Aus Fluoridverunreinigungen von käuflichen Standardlösungen resultieren teils hohe Blindwerte, da die Standards in seltenen Fällen auf Fluor getestet werden. Die intakte Tantalfolie leistet keinen Beitrag zur Blindwerterhöhung und kann als permanenter Modifier eingesetzt werden.

Sie zeigt eine hohe Temperaturstabilität, erhöht die maximalen Messungszyklen des Grafitrohrs und muss nur ein- bis zweimal in der Lebenszeit eines Rohres angepasst werden.

Um Fluorrückstände aus Proben vorheriger Messungen zu vermindern, musste die gesamte Ofenapparatur vor jeder Messreihe intensiv gereinigt werden. Es stellte sich als vorteilhaft heraus einen Dosierschlauch eigens für die Fluormessungen zu verwenden, der am Ende jeder Messreihe mehrmals mit Methanol gespült und trocken gelagert wurde. Anderenfalls könnten sich schrittweise kleine Restmengen an Fluor aus dem Herstellungsprozess des Dosierschlauch herauslösen und die Ergebnisse der folgenden Messungen erhöhen.

Vor jeder Messung wurden zur Überprüfung der erfolgreichen Reinigung Blindwertmessungen mit Reinstwasser und Galliumnitratmodifizierlösung durchgeführt. Bei den wässrigen Proben zeigten diese Bestimmungen durchschnittliche Absorptionen von 0,080. Bei der Vermessung von Zellsuspensionen erhöhten sich die Absorptionen der Blindwerte auf durchschnittlich 0,110. Mit der Vermessung der Proben wurde erst begonnen, wenn die entsprechenden Absorptionen erreicht wurden und über zehn Blindwertmessungen stabil blieben. Wenn ein Grafitrohr diese Blindwertabsorptionen nicht mehr erreichen konnte, war dies ein Indiz dafür, dass die Tantalbeschichtung spröde geworden ist und sich Risse gebildet haben. Das Rohr musste dann neu ausgekleidet werden oder gegen ein neues ersetzt werden.

Die Methode wurde auf Linearität und Verschleppung von Proberückständen (Memory-Effekte) überprüft. Des Weiteren wurden alle verwendeten Stammlösungen im Vorfeld der Messungen auf Fluorverunreinigungen getestet.

4.2.1.1 Überprüfung von Fluorverunreinigungen in den verwendeten Reagenzien

Überprüfung des verwendeten Reinstwassers

Es wurden 24 aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt, bei denen 20 µL Reinstwasser in ein tantalbeschichtetes Standardgrafitrohr injiziert wurden. Die Messwerte zeigten eine maximale Absorption von 0,0001 ohne ein erkennbares Galliummonofluoridsignal im 3D Spektrum (Abb. 41).

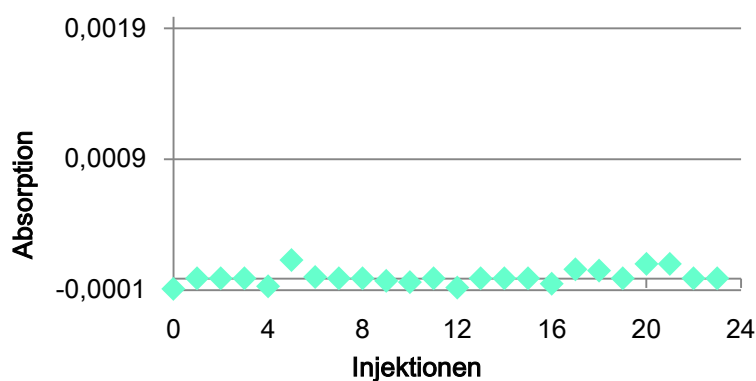


Abb. 40: Blindwertmessungen bei alleiniger Zugabe des Reinstwassers in entsprechender Qualität in ein tantalbeschichtetes Standardgrafitrohr

Überprüfung des Galliumnitratstandards

Die erste verwendete Galliumnitrat-Charge wies eine Reinheit von 99,99 % auf. Es wurden wässrige Lösungen mit 7,5 g Galliumnitrat/L und 10,0 g Galliumnitrat/L hergestellt und wie im Temperaturprogramm (Kapitel 8.10.2) beschrieben mit 20 µL Reinstwasser vermessen. Die Blindwertmessungen zeigten deutliche Signale mit Absorptionen zwischen 0,300 und 0,500. Dies wies auf große Mengen an Fluorverunreinigungen in diesem Standard hin. Daraufhin wurde eine weitere Galliumnitrat-Charge mit einer höheren Reinheit von 99,999 % verwendet. Die Messungen wurden wie vorher beschrieben durchgeführt.

Die Darstellung der 24 aufeinanderfolgenden Blindwertmessungen zeigen sehr niedrige Absorptionswerte mit einer mittleren Absorption von $0,078^{+/-0,026}$ für Wasser (Abb. 42) und $0,110^{+/-0,036}$ für die Zellsuspensionen (1,0 mg Protein/mL) auf der Wellenlänge des Galliummonofluorids. Für alle folgenden Messungen wurden aus dieser Galliumnitrat-Charge Stammlösungen hergestellt und angewendet.

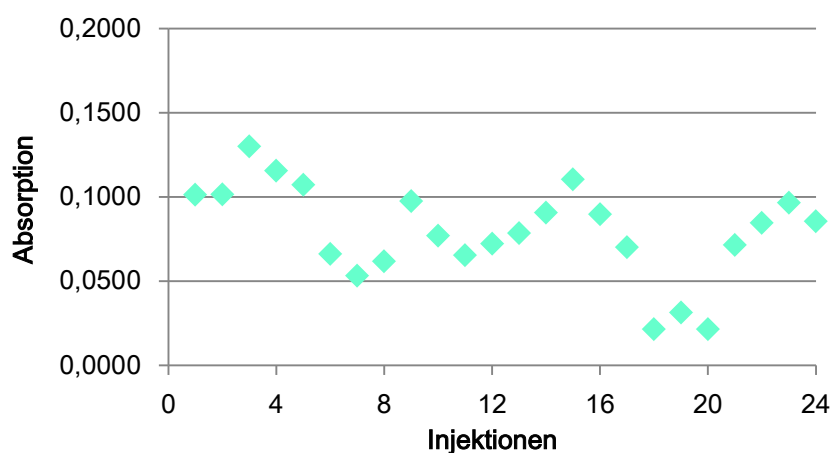


Abb. 41: Blindwertmessungen von Reinstwasserinjektionen mit Zugabe von Galliumnitratlösungen als Molekülbildungsreagenz in ein tantalbeschichtetes Standardgrafitrohr

4.2.1.2 Überprüfung der Linearität

Zur Überprüfung der Linearität wurde untersucht, ob ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Konzentrationsänderung des Fluorids und dem Messsignal erkennbar ist. Als erstes wurde eine wässrige Natriumfluoridstammlösung hergestellt und nach der beschriebenen Methode in Kapitel 8.10.2 vermessen (Abb. 43).

Die Messwerte des gut wasserlöslichen Natriumsalzes weisen eine lineare Beziehung zwischen der Konzentration des Analyten und der Intensität des Messsignals in einer wässrigen Lösung nach (Abb. 44). Als weiterer Schritt wurden die fluorhaltigen

Goldkomplexe **3a** und **4a** in einer biologischen Zellsuspensionsmatrix vermessen, wie sind in den Zellaufnahme Versuchen (Kapitel 4.2.3) angewendet wird (Abb. 44 und 45).

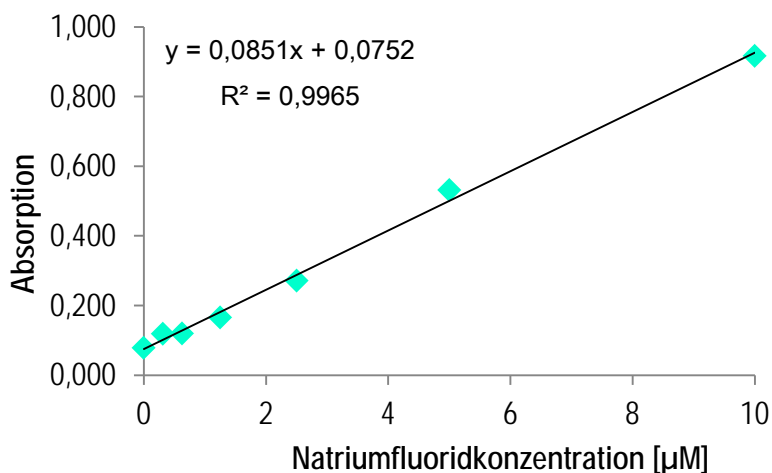


Abb. 42: Kalibriergerade einer wässrigen Natriumnitrat Verdünnungsreihe (31,25 nM – 10,00 µM)

Für die Verbindung **3a** wurde eine Konzentration von 1,0 mg Zellprotein/mL Wasser ausgewählt, für Komplex **4a** eine Konzentration von 0,5 mg Zellprotein/mL Wasser. Da bereits bekannt war, dass unter Versuchsbedingungen mit fetalem Kälberserum die mono-NHC Goldkomplexe (darunter auch **3a**) eine eher geringere Zellaufnahme zeigen und die bis-NHC Goldkomplexe (wie **4a**) dagegen eine eher höhere, wurden die Messbedingungen entsprechend angepasst. Die Zellsuspensionen der Proben wurden in diesem Versuch für die AAS/MAS-Quantifizierungen des Metalls/Halogens auf Konzentrationen zwischen 0,25 – 1,5 mg Zellprotein/mL Wasser eingestellt, um eine ausreichende Analytmenge bei der Injektion zu garantieren. Da der mono-NHC Goldkomplex **3a** weniger stark in die Zellen aufgenommen wird, wurde bei dieser Verbindung eine höhere Proteinmenge von 1,0 mg Protein/mL injiziert (Abb. 44). Für die stärker akkumulierenden bis-NHC Komplexe, wie Komplex **4a**, reicht eine Proteinkonzentration von 0,5 mg Protein/mL aus, um das GaF/Gold zuverlässig zu detektieren (Abb. 45).

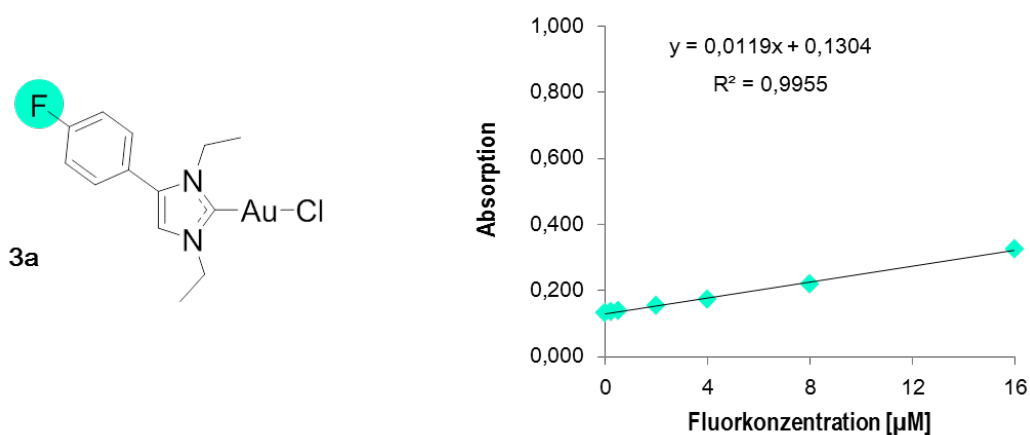


Abb. 43: Verdünnungsreihe von mono-NHC Komplex 3a in MCF-7 Zellsuspension (1,0 mg Zellprotein/mL Wasser)

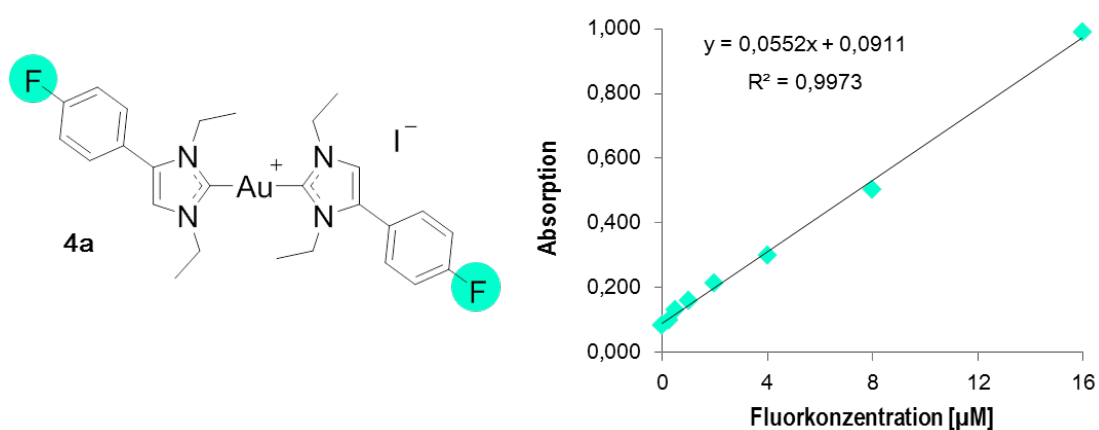


Abb. 44: Verdünnungsreihe von bis-NHC Komplex 4a in MCF-7 Zellsuspension (0,5 mg Zellprotein/mL Wasser)

In beiden Fällen konnte der lineare Zusammenhang anhand der Korrelationskoeffizienten von $> 0,995$ bestätigt werden. Die unterschiedlichen Proteinkonzentrationen spiegeln sich in den verschiedenen Y-Achsenabschnitten (Blindwert) der Grafen wieder. Zum Vergleich zur Blindwertmessung (Absorption 0,078) steigt die Absorption des Nullwerts auf 0,091 (für 0,5 mg Protein/mL) bzw. 0,130 (für 1,0 mg Protein/mL) bei der Detektion in der Zellsuspensionsmatrix an.

4.2.1.3 Prüfung auf Verschleppung (Memory-Effekte)

Im letzten Test soll herausgefunden werden, ob das Ausheizen des Ofens effektiv ist und in diesem Prozess alle Proberückstände von vorherigen Messungen im Grafitrohr und Ofen entfernt werden.

Dazu wurden bei ständiger Zugabe des Molekülbildungsreagenz abwechselnd Wasserproben (Injektion 1 – 2 und 4 – 13) und einmalig eine wässrige Natriumfluoridprobe (Injektion 3) vermessen (Abb. 46). Die Auswertung ergab einen sprunghaften Anstieg der Absorption für die Messung der Natriumfluoridprobe. Die Nullwertmessungen vor und nach der Natriumfluoridinjektion waren auf einem identischen niedrigen Level im Bereich der Blindwertmessungen. Somit sind keine Verschleppungen der Probe in Form von Memory-Effekten erkennbar.

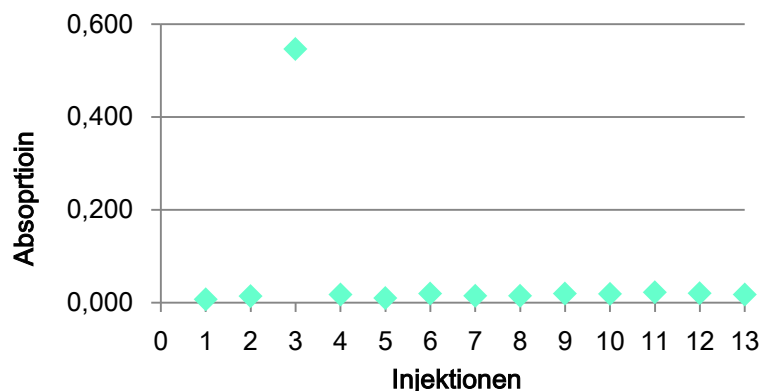


Abb. 45: Test auf Verschleppung von Proberückständen mittels Natriumfluorid Standard und Reinstwasser
Injektion 1-2 = Wasser, 3 = 10 μ M NaF, 4-13 = Wasser

Nachdem die wichtigsten Parameter nach der Einführung der Methode überprüft worden waren, wurde die Methode zur Quantifizierung des Fluorgehalts neben dem Goldgehalt in den Zellaufnahmestudien (Kapitel 4.2.3) angewendet.

4.2.2 Proteinbindungsstudien mit Serumalbumin und fetalem Kälberserum

Für die Kultivierung von Zellen im Labor werden meist Kulturmedien nach etablierten Standardrezepturen verwendet, welche den Zellen die wichtigsten Grundnährstoffe liefern. Das gängigste Medium ist das Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). [293] Es enthält verschiedene anorganische Salze, Aminosäuren und Vitamine. Je nach Anforderung wird das Medium durch verschiedene Zusätze modifiziert. In den Proteinbindungsstudien, als auch in den Zellaufnahmeversuchen dieser Arbeit wurde ausschließlich DMEM mit einem Zusatz von Natriumpyruvat und einer erhöhten Konzentration von Glucose, als Energiequelle für schnell proliferierenden Tumorzellen, verwendet. Der Zusatz Natriumhydrogencarbonat puffert die entstehenden sauren Stoffwechselprodukte ab und der Phenolrotindikator dient zur Kontrolle des pH Wertes in der Kultur.

Bei vielen Zelllinien reichen die Standardmedien für die Kultivierung alleine nicht aus. Von vielen Herstellern wird deshalb eine Supplementierung mit fetalem Kälberserum (FCS) empfohlen. FCS ist ein Naturprodukt, welches aus dem Blut von Kälberföten gewonnen wird. Es enthält verschiedene Proteine (Transportproteine wie Albumin und Transferrin), Adhäsionsfaktoren, Enzyme, (Wachstums-)Hormone, Wachstumsfaktoren, Proteaseinhibitoren, Fettsäuren, Lipide, Vitamine und Spurenelemente. [294, 295]

Die Anwendung von FCS in der Zellkultur steht seit Jahren unter heftiger Diskussion, da es nur durch eine kardiale Punktion von Kälberföten in einer qualvollen halbstündigen Prozedur isoliert werden kann. [296, 297] Daraufhin wurde mit der Entwicklung von Ersatzzusätzen begonnen, woraus bis heute allerdings keine gleichwertigen Reagenzien für eine serumfreie Kultivierung resultierten. Ein großes Problem liegt darin, dass im Kälberserum eine Vielzahl von verschiedenen Inhaltsstoffen enthalten sind, die bis heute noch nicht komplett identifiziert werden konnten. [296, 298] Neben der ethischen Diskussion ist die große

Varianz der FCS-Chargen ein Problem für die Reproduzierbarkeit der Experimente. Die einzelnen Komponenten unterscheiden sich oft stark in ihrem Gehalt und der Qualität. Ein standardisierter FCS-freier Zusatz würde auch hier Abhilfe schaffen. [296, 298] Für alle Experimente dieser Arbeit wurde deshalb ein standardisiertes Serum hinzugesetzt, bei dem laut dem Hersteller große Schwankungen zwischen den Chargen ausgeglichen sein sollen. Ein weiterer Nachteil der Verwendung von FCS liegt in den immer wieder auftauchenden Verunreinigungen durch Krankheitserreger wie Endotoxine, Viren, Mykoplasmen und Prionen, auf die nicht unbedingt bei der Chargenfreigabe getestet werden müssen. [298]

Die Bindung von Arzneistoffen an Proteine hat einen großen Einfluss auf die Bioverteilung im Organismus. Albumin gilt als das meist vertretende Serum- und Transportprotein im Blut. Eine stark affine Proteinbindung kann zu einer Inaktivierung eines Arzneistoffs führen und so verhindern, dass dieser seine Zielstrukturen erreicht oder in die Zellen aufgenommen werden kann. Die Folge wäre eine verringerte oder komplett aufgehobene Wirkung. In den folgenden Versuchen soll daher das Bindungsverhalten an das isolierte Transportprotein Albumin, als auch an die Gesamtproteine des fetalen Kälberserums untersucht werden.

Die verwendete Methode zur Bestimmung der Proteinbindung beruht auf der Ethanolpräzipitation. Dabei werden Stammlösungen der Testverbindungen in DMF oder DMSO hergestellt und mit DMEM Zellkulturmedium verdünnt, welches entweder eine definierte Menge an fetalen Kälberserum oder Serumalbumin enthält. Diese Proben werden dann bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Probeentnahme der Aliquote wurde zu vorher festgelegten Zeitpunkten durchgeführt. Die Proteine der einzelnen Proben wurden mit kaltem Ethanol ausgefällt und nach dem Zentrifugieren abgetrennt. Der Überstand stellte die ungebundene Fraktion dar, aus welcher die Konzentration des Metalls mittels Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt wurde. Damit konnte auf den proteingebundenen

Goldgehalt zurückgerechnet werden. Das Methodenprotokoll und die detaillierte grafische Darstellung des Versuchs sind in Kapitel 8.8 zu finden.

Die Inkubationskonzentrationen entsprechen den jeweiligen durchschnittlichen IC_{50} Werten im Zytotoxizitätsassay und wurden ebenfalls in den Zellaufnahmestudien gewählt, sodass die Ergebnisse der verschiedenen Experimente miteinander vergleichbar sind.

4.2.2.1 Mono-NHC Gold(I)komplexe

Die mono- NHC Gold(I)Komplexe **3a** – **3e** binden alle mit einem Anteil zwischen 80 – 100 % an die Gesamtproteine des Kälberserums. Die Bindung an das isolierte Serumalbumin (BSA) liegt hingegen bei 95 – 100 %. Entscheidende Unterschiede im Bindungsverhalten zwischen den verschiedenen mono-NHC Gold(I)komplexen über den Zeitraum von zwei Tagen konnte nicht festgestellt werden. Alle Verbindungen **3a** – **3e** zeigen bei einer Inkubationskonzentration von 12 μ M in beiden Versuchen eine fast vollständige Proteinbindung (Abb. 47).

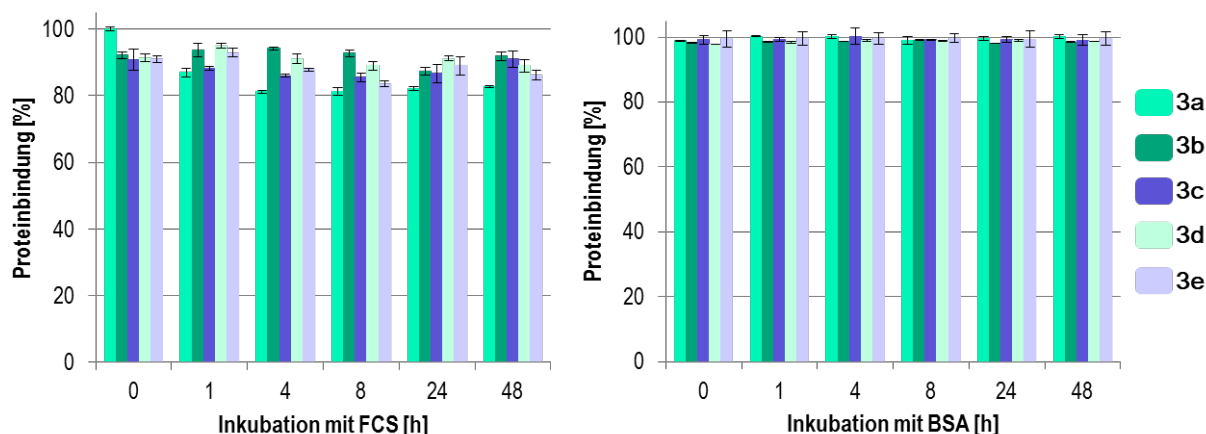


Abb. 46: Proteinbindungsstudien der mono-NHC Gold(I) Komplexe **3a** – **3e** mit fetalem Kälberserum (links) und Rinderserumalbumin (rechts) bei einer Inkubationskonzentration von 12 μ M

4.2.2.2 Bis-NHC Gold(I)komplexe

Die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** – **4e** zeigen eine moderate bis geringe Proteinbindung. (Abb. 48) Ein signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation mit FCS und BSA konnte nicht festgestellt werden. Eine besonders geringe Proteinbindung zeigen die beiden größten Komplexe **4a** (FCS: 10 % – 21 %, BSA: 7 % – 18 %) und **4b** (FCS: 4 % – 23 %, BSA: 8 % – 27 %). Eine moderate Proteinbindung ist bei den kleineren Komplexen **4c** (FCS: 34 % – 56 %, BSA: 38 % – 52 %), **4d** (FCS: 44 % – 55 %, BSA: 28 % – 58 %) und **4e** (FCS: 34 % – 55 %, BSA: 31 % – 51 %) zu erkennen. Weitere strukturell bedingte Affinitätsunterschiede unter den verschiedenen Komplexen zu den Proteinen konnten hier nicht festgestellt werden.

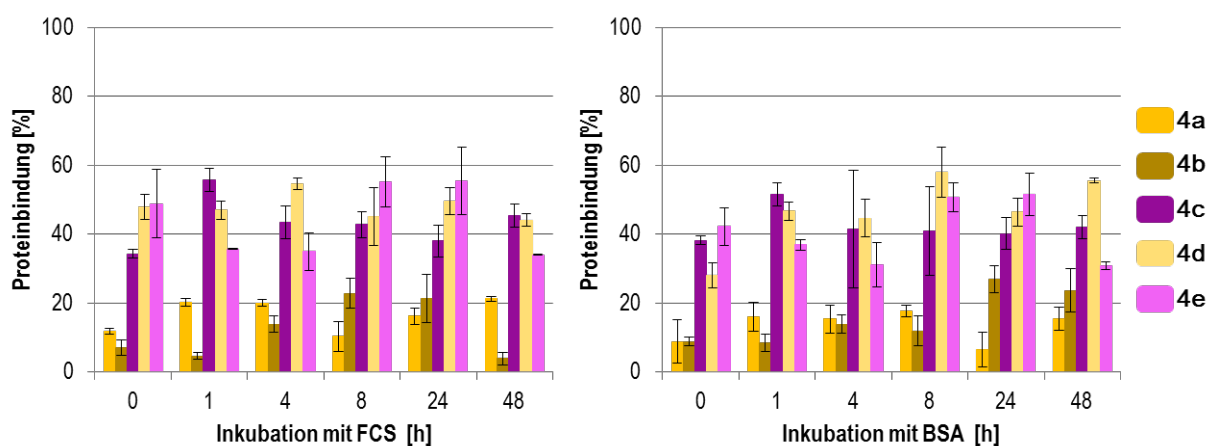


Abb. 47: Proteinbindungsstudien der bis-NHC Gold(I) Komplexe **4a** – **4e** mit fetalem Kälberserum (links) und Rinderserumalbumin (rechts) bei einer Inkubationskonzentration von 3 μ M

4.2.2.3 Goldhaltige Referenzen

Bei den goldhaltigen Referenzen Auranofin **R1** und AuCl **R3** liegen die Proteinbindungen in einem moderaten Bereich. Auranofin zeigt Werte von 73 – 97 % in der Gegenwart von FCS Proteinen und 64 – 86 % bei BSA. Das AuCl **R3** weist vergleichbare Werte auf (FCS: 79 – 94 % und BSA: 78 – 93 %), tendenziell liegen diese aber im Durchschnitt etwas höher als beim

Auranofin **R1**. Die Proteinbindung findet bei beiden Verbindungen sofort nach Probenzugabe statt (Abb. 49).

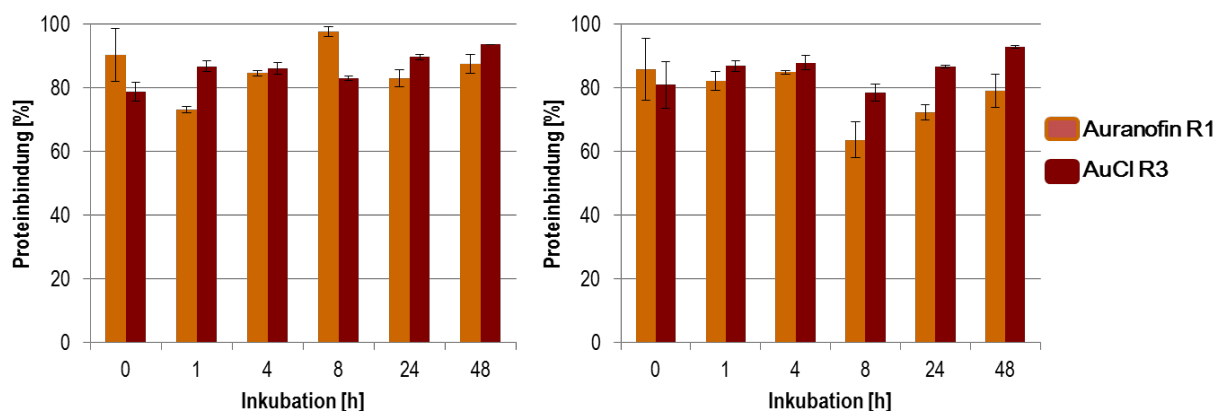


Abb. 48: Proteinbindungsstudien der Referenzen Auranofin **R1** bei einer Inkubationskonzentration von 3 μM und AuCl **R3** bei einer Inkubationskonzentration von 12 μM mit fetalem Kälberserum (links) und Rinderserumalbumin (rechts)

4.2.2.4 Zusammenfassung

Die strukturell unterschiedlichen Komplexserien zeigen innerhalb ihrer Gruppe ein eher homogenes Verhalten bezüglich der Affinität zu den verschiedenen Proteinen. Zwischen den Gruppen unterscheiden sie sich jedoch merklich. Während die mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** – **3e** fast vollständig an die Serumproteine gebunden vorliegen, zeigen die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** – **4e** nur ein moderates bis geringes Bindevermögen. Die beiden Goldreferenzen Auranofin **R1** und AuCl **R3** werden etwas weniger stark an die Proteine gebunden als die mono-NHC Gold(I)komplexe, aber liegen zu einem größeren Anteil im Vergleich zu den bis-NHC Gold(I)komplexen gebunden vor. Die Versuche belegen, dass Albumin und andere Serumproteine den im Zellkulturmedium/Blut frei vorliegenden Anteil der Komplexe im unterschiedlichen Maß verringern und damit die Bioverfügbarkeit beeinflussen können.

4.2.3 Zellaufnahmestudien in MCF-7 Brustkrebszellen

Die folgenden Experimente stellen die zeitabhängige Bestimmung der Zellaufnahme von verschiedenen Verbindungen in der MCF-7 Brustkrebszelllinie dar. Die Versuche wurden gleichzeitig mit FCS-haltigen Zellkulturmedium und mit serumfreien Zellkulturmedium durchgeführt, um einen möglichen Einfluss des Serums auf die Zellaufnahme weiterführend zu untersuchen.

Für die ungeladenen (Benz)Imidazole und die kationischen (Benz)Imidazoliumiodide wurden exemplarisch die Verbindungen mit den fluorierten Phenylimidazolgrundkörper **1a** und **2a** untersucht. Diese Verbindungen enthalten kein Metall zur Detektion mit der Atomabsorptionsspektroskopie, können aber dennoch über den Fluorsubstituenten mittels HR-CS MAS quantifiziert werden. Die Konzentrationsbestimmung sämtlicher Goldkomplexe dieser Arbeit **3a – 3h** und **4a – 4e** wurden über das Goldzentralatom durchgeführt. Abschließend wurde für die fluorierten mono- und bis NHC Gold(I)komplexe **3a** und **4a** eine differenzierte Quantifizierung des Fluor- und Goldgehalts aus demselben Reaktionsansatz dargestellt, um die Bioverteilung und die Stabilität während der Zellaufnahme, als auch mögliche Metabolisierungsvorgänge in den Zellen genauer zu betrachten.

4.2.3.1 Phenylimidazol und Phenylimidazoliumiodid

Exemplarisch wurden die beiden Reaktionsvor- und Zwischenstufen der Gold(I)komplexe betrachtet. Das Phenylimidazol **1a** (Abb. 50, dunkelblau) als auch das Phenylimidazoliumiodid **2a** (Abb. 50, hellblau) wurden über ihren Fluorsubstituenten mittels der Molekülabsorptionsspektroskopie quantifiziert. Bei beiden Verbindungen wurde die Inkubation der MCF-7 Zellen mit einer Konzentration von 12 μ M durchgeführt.

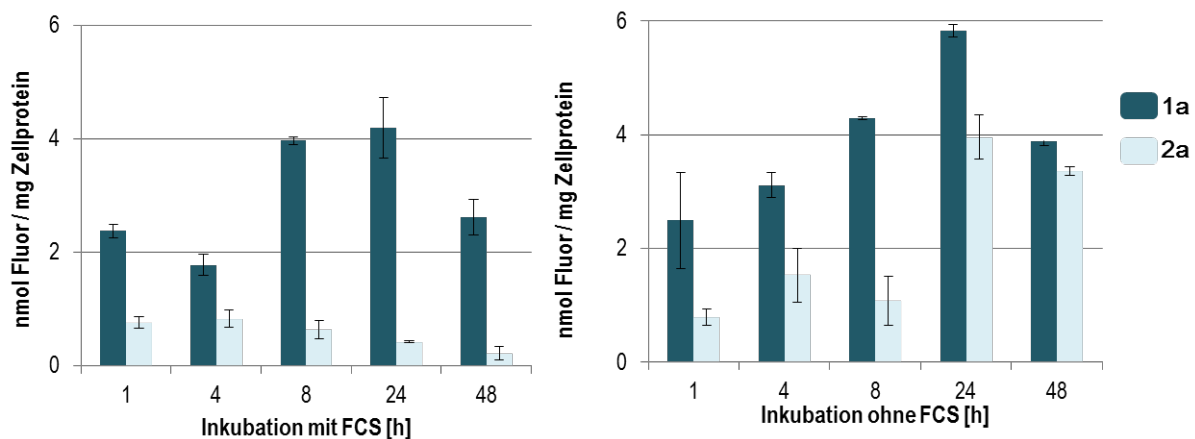


Abb. 49: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen der nicht komplexierten Vorstufen **1a** (4'-Phenylimidazol) und **2a** (fluoriertes Phenylimidazoliumiodid) mit einer Konzentration von 12 μM , links in Anwesenheit von FCS-haltigen Zellkulturmedium, rechts ohne die Supplementierung

Das neutrale Phenylimidazol **1a** erlangt sein intrazelluläres Konzentrationsmaximum in beiden Versuchen nach 24 Stunden, danach sank der Fluorgehalt wieder ab. Tendenziell sind die Fluorlevel in dem Versuch ohne den FCS-Zusatz geringfügig höher (Maximum bei 24 Stunden: ca. 4,2 nmol/mg Protein mit FCS, ca. 5,8 nmol/mg Protein ohne FCS). Das kationische Phenylimidazoliumiodid **2a** wird weniger in die Zellen aufgenommen. Es erreicht bei Zusatz von FCS ein Maximum mit 0,8 nmol/mg Protein nach 4 Stunden, ohne fetales Kälberserum erlangt es seine Höchstkonzentration von 4 nmol/mg Protein nach 24 Stunden. In beiden Ansätzen wird das Fluor nach Erreichen der individuellen Maximalkonzentration wieder aus den Zellen ausgeschleust. Dies ist an den abnehmenden Konzentrationen erkennbar.

Das fetale Kälberserum hat bei der neutralen Verbindung **1a** einen weniger starken Einfluss auf die Zellaufnahme als bei dem kationischen Liganden **2a**, dies spiegelt sich im Vergleich der Grafen einer Verbindung aus den unterschiedlichen Versuche wieder.

4.2.3.2 Mono-NHC Gold(I)komplexe

Die Zellaufnahme in MCF-7 Brustkrebszellen wurde für die Serie der mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** – **3e** mit einer Konzentration von 12 μM untersucht. (Abb. 51) Eine Inkubation bei einer geringeren Konzentration von 3 μM brachte keine aussagekräftigen Ergebnisse bei sehr geringen Signalen knapp über der Detektionsgrenze.

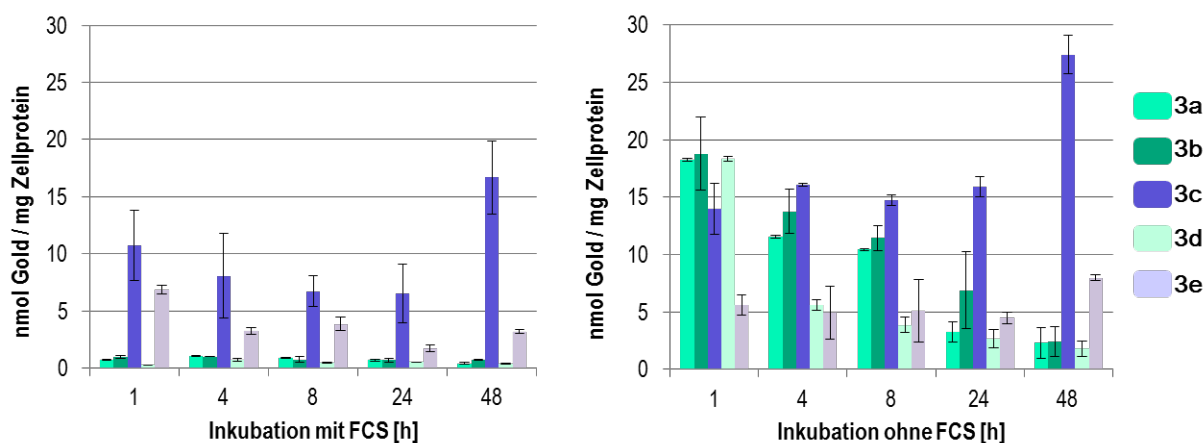


Abb. 50: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen der Komplexe **3a** – **3e** mit einer Konzentration von 12 μM , links in Anwesenheit von FCS, rechts ohne die Supplementierung

Im Versuch ohne FCS wurden bei fast allen Komplexen nach einer Stunde höhere Konzentrationen in den Zellen gemessen als im Versuch mit FCS. Für Substanz **3d** wurde initial das 67-Fache (ab 4 Stunden 5- bis 8-Fache), bei **3a** das 27-Fache (ab 4 Stunden 5- bis 12-Fache), bei **3b** das 19-Fache (nach 4 Stunden das 3- bis 16-Fache), bei **3c** 3-Fache gefunden. Bei **3e** war die Konzentration geringfügig niedriger.

Bei den nicht halogenhaltigen Goldkomplexen **3c** und **3e** sind demzufolge nur geringfügig höhere Konzentrationen ohne FCS in den Zellen zu finden. Auffällig sind bei diesen Verbindungen jedoch die starken Konzentrationszunahmen zwischen 24 Stunden und 48 Stunden um ungefähr das Doppelte in beiden Versuchsansätzen (Abb. 51).

Die halogenierten Pendants werden dagegen ohne den FCS-Zusatz initial sehr stark in die Zellen aufgenommen und erreichten nach einer Stunde die maximalen Konzentrationen (ca. 18 – 19 nmol/mg Protein). Schließlich nimmt die Goldkonzentration über zwei Tage kontinuierlich bis auf ca. 2 nmol/mg Protein ab. Im Versuchsansatz mit FCS wurden die Höchstwerte erst nach 4 Stunden erreicht (**3a** und **3b** um 1,0 nmol/mg Protein, **3e** um 0,7 nmol/mg Protein). Ab 4 Stunden werden die Substanzen kontinuierlich aus der Zelle ausgeschleust. Die halogenierten Goldkomplexe **3a**, **3b** und **3d** gelangen initial bei Abwesenheit von FCS verstärkt in die Zellen, im Gegensatz zu den nicht halogenierten Derivaten **3c** und **3e**. Nach 24 – 48 Stunden liegt ihr Gehalt unter denen der nicht halogenierten Verbindungen.

4.2.3.3 Bis-NHC Gold(I)komplexe

Die Zellaufnahme in MCF-7 Brustkrebszellen wurde für die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** – **4e** aufgrund der großen antiproliferativen Aktivität der Komplexe bei einer Konzentration von 3 μ M untersucht. Die Zellen wurden auch hier über zwei Tage inkubiert und auf einen Einfluss von FCS im Zellkulturmedium getestet (Abb. 52).

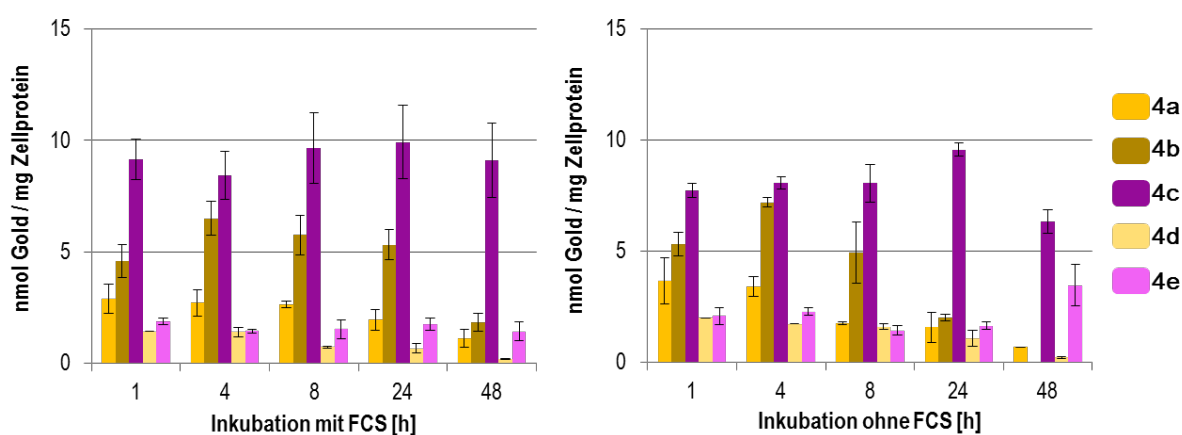


Abb. 51: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen der Komplexe **4a** – **4e** mit einer Konzentration von 3 μ M, links in Anwesenheit von FCS im Zellkulturmedium, rechts ohne die Supplementierung

Die zellulären Goldkonzentrationen erreichen bei fast allen Testsubstanzen ein Maximum nach 1 – 4 Stunden, unabhängig davon, ob dem Reaktionsansatz fetales Kälberserum zugesetzt wurde. Nur bei Komplex **4c** werden bei beiden Versuchen die Maximalkonzentrationen erst nach 24 Stunden erreicht. Es zeigten sich nur geringfügig höhere Konzentrationen ohne FCS im Vergleich zum FCS-haltigen Ansatz. Die bis-NHC Gold(I)komplexe mit dem voluminöseren Phenylimidazolliganden **4a** – **4c** wurden stärker in die Zelle aufgenommen und erreichten etwas höhere maximale intrazelluläre Konzentrationen (**4c**: mit FCS ca. 9 nmol/mg Protein / ohne FCS 8 nmol/mg Protein, **4b**: mit FCS ca. 6,5 nmol/mg Protein / ohne FCS ca. 7 nmol/mg Protein, **4a**: mit FCS ca. 3 nmol/mg Protein / mit FCS ca. 3,5 nmol/mg Protein) als die Verbindungen mit dem kleineren Imidazolliganden **4e** (mit FCS ca. 1,7 nmol/mg Protein / ohne FCS ca. 2,3 nmol/mg Protein) und **4d** (mit FCS ca. 1,5 nmol/mg Protein / ohne FCS 2,0 nmol/mg Protein). Bis auf bei Verbindung **4c** liegen die Maximalkonzentrationen im Ansatz ohne FCS immer geringfügig über denen im Versuch mit FCS.

4.2.3.4 Goldhaltige Referenzen

Als Referenzstrukturen wurde der Gold(I)komplex Auranofin **R1** mit einer Konzentration von 3 μ M und das Goldsalz AuCl **R3** mit einer Konzentration von 12 μ M untersucht (Abb. 53). Die Konzentration konnte beim Auranofin nicht höher gewählt werden, da die Zellen die Inkubation nicht überlebt haben.

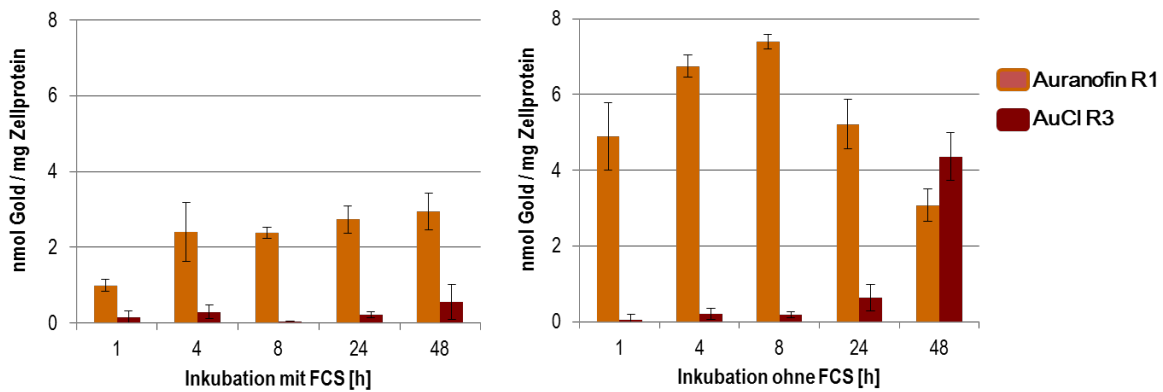


Abb. 52: Zellaufnahme in MCF-7 Zellen der Referenzen Auranofin R1 mit einer Konzentration von 3 μM und AuCl R3 mit einer Konzentration von 12 μM , links in Anwesenheit von FCS im Zellkulturmedium, rechts ohne die Supplementierung

Bei beiden Referenzen ist mit FCS ein stetiger Anstieg der Goldkonzentration in den Zellen bis zum letzten Zeitpunkt bei 48 Stunden zu erkennen. Obwohl das AuCl R3 mit einer 4-fach höheren Konzentration inkubiert worden ist, liegt der zelluläre Goldgehalt bei jedem Zeitpunkt deutlich unter dem des Auranofin R1. Bei dem AuCl R3 ist nach 48 Stunden ca. halb so viel Gold in den Zellen zu finden (0,56 nmol/mg Protein) wie beim Auranofin nach nur einer Stunde (0,99 nmol/mg Protein). Auranofin R1 zeigt eine Maximalkonzentration bei Versuchsende von 2,94 nmol/mg Protein, dies entspricht der 5,3-fachen Konzentration des AuCl R3 zu demselben Zeitpunkt.

Wird der Versuch ohne das Supplement durchgeführt zeigt AuCl R3 bis zu 8 Stunden vergleichbare Werte zum Versuch mit Serum. Dann steigt die Konzentration stark an und erreicht nach 48 Stunden eine Maximalkonzentration von 4,36 nmol/mg Protein. Im Vergleich zum Versuch mit FCS ist die Endkonzentration um das 7,8-Fache höher.

Der Einfluss des fetalen Kälberserums auf die Zellaufnahme ist beim Auranofin R1 sofort zu erkennen. Nach einer Stunde sind bereits Konzentrationen von 4,89 nmol/mg Protein erreicht worden. Diese entspricht einer 4,9-fachen Zellkonzentration im Vergleich zum vorherigen Versuch nach der gleichen Zeit. Nach 8 Stunden ist das Konzentrationsmaximum

von 7,40 nmol/mg Protein erreicht, woraufhin das Gold verstärkt aus der Zelle ausgeschleust wird und nach 48 Stunden nur noch einen intrazellulären Gehalt von 3,08 nmol/mg Protein zeigt. Damit liegt die Konzentration nach Versuchsende unter dem des AuCl **R3** (4,89 nmol/mg Protein).

4.2.3.5 Bestimmung der intrazellulären Fluor- und Goldkonzentration von **3a** und **4a**

Für eine genauere Betrachtung der Zellaufnahme der Komplexe **3a** und **4a** wurde eine Gold- als auch Fluorquantifizierung aus denselben Proben mittels AAS/MAS durchgeführt. Aus diesen Versuchen kann abgeleitet werden, ob sich während der Zellaufnahme die Verbindungen in irgendeiner Weise zersetzten und in welchem Verhältnis der Ligand (Fluor) im Vergleich zum Gold in den Tumorzellen zu finden ist. Dies sind neue wichtige Versuche zur Beschreibung der pharmakokinetischen Eigenschaften und dem Aufnahmemechanismus der NHC-Gold(I)komplexe, auf dem ein wichtiger Fokus dieser Arbeit lag.

Bei dem mono-NHC Gold(I)komplex **3a** ist nach einer Stunde ungefähr die zwei- bis dreifache Menge an Fluor (mit FCS ca. 1,8 nmol/mg Protein, ohne FCS ca. 36,0 nmol/mg Protein) im Vergleich zu den jeweiligen Goldkonzentrationen (mit FCS ca. 0,6 nmol/mg Protein, ohne FCS ca. 18,0 nmol/mg Protein) in den Zellen zu finden (Abb. 54). Bei der Messung der Komplexe im FCS-freien Medium sind initial 20- bis 30-fach höhere Konzentrationen der beiden Analyten gefunden worden. Ab einer Inkubationsdauer von 4 Stunden wird in beiden Experimenten das Gold im Vergleich zum Fluor verstärkt aus den Zellen ausgeschleust. Die Fluorkonzentration nimmt im geringeren Maße ab. Das Konzentrationsverhältnis von Gold zu Fluor, welches in den Zellen detektiert wurde, entspricht zu keinem Zeitpunkt den erwarteten äquivalenten Stoffmengenkonzentrationen, wie sie aus der Molekülstruktur ersichtlich sind (Abb. 54, Struktur **3a**).

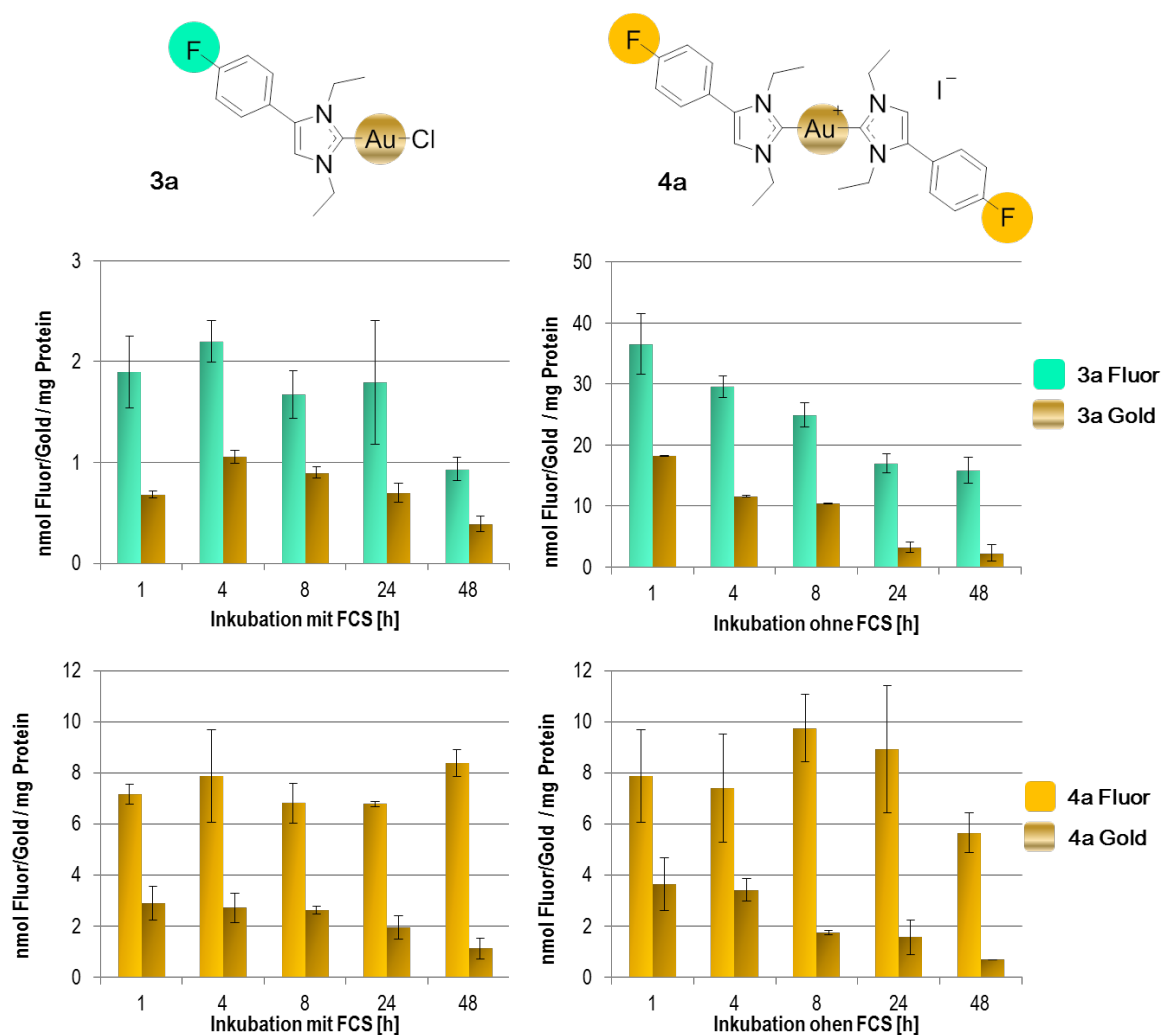


Abb. 53: Zeitabhängige Zellaufnahme der Komplexe 3a (oben: Inkubationskonzentration 12 μM) und 4a (unten: Inkubationskonzentration 3 μM) in MCF-7 Zellen, jeweils mit Zusatz von FCS (links) und ohne FCS (rechts).

Bei dem bis-NHC Gold(I)komplex **4a** ist auch nach einer Stunde ungefähr die doppelte Konzentration an Fluor im Vergleich zum Gold in den Zellen detektiert worden (Fluor 7 – 8 nmol/mg Protein, Gold 3 – 4 nmol/mg Protein). Das Verhältnis von den Fluor- zu Gold (2:1) stimmt mit der molekularen Struktur bis zu einer Inkubationszeit von einer Stunde bei beiden Experimenten überein (Abb. 54, Struktur **4a**). Während der Fluorgehalt in beiden Versuchen über die 48 Stunden nur sehr wenig abnimmt, sinken die Goldkonzentrationen deutlich und kontinuierlich ab (Endkonzentration ca. 1 nmol/mg Protein). Im Experiment ohne FCS konnten zu allen Zeitpunkten nur geringfügig höhere Goldkonzentrationen in den Zellen nachgewiesen werden.

4.2.3.6 Zusammenfassung

Ein großer Einfluss von FCS auf die Zellaufnahme in MCF-7 Tumorzellen konnte für den kationischen fluorierten Phenylimidazolliganden **2a**, die ungeladenen mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** – **3h** und die Referenzsubstanzen Auranofin **R1** und AuCl **R3** festgestellt werden. Keinen signifikanten Einfluss hatte das FCS auf die Zellaufnahme bei dem neutralen 4'-Phenylimidazol **1a** und die kationischen bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** – **4e**.

Mit FCS-supplementierten Zellkulturmedium zeigten die geringste Zellaufnahme das freie AuCl **R3**, der freie kationische 4'-Phenylimidazolimidid **2a**, die halogenierten mono-NHC Komplexe **3a**, **3b** und **3d** und das ungeladene 4'-Phenylimidazol **1a**. Durch die Koordination der Liganden an das Goldzentralatom kann die Zellaufnahme gesteigert werden und ist stark abhängig von der Art der Liganden (Abb. 55).

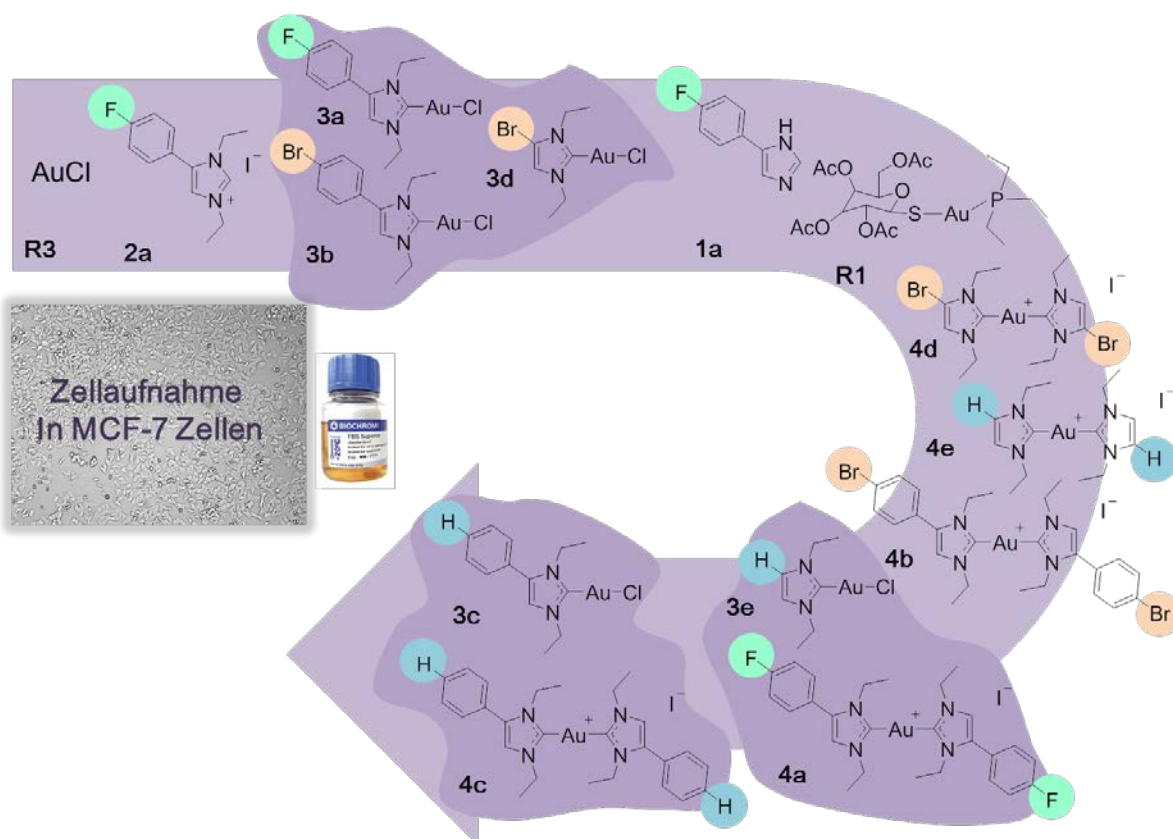


Abb. 54: Zunahme der intrazellulären Konzentration im Zellaufnahmeversuch mit fetalen Kälberserum, Verbindungen mit einer dunklen Umrandung sind von den Zellkonzentrationen gleichzusetzen

Die Ergebnisse zeigen, dass die positiv geladenen bis-NHC Komplexe **4a** – **4e** und die nicht halogenierten mono-NHC Komplexe **3c** und **3e** bevorzugt in die Zellen aufgenommen werden. Tendenziell ist zu erkennen, dass die halogenierten Verbindungen im geringeren Ausmaß in den Zellen akkumulieren. Die höchsten zellulären Konzentrationen konnten für die mono- und bis-NHC Gold(I)komplexe **3c** und **4c** mit einem nicht halogentragenden Phenylimidazolliganden gemessen werden.

Die Quantifizierung von Fluor und Gold in den Verbindungen **3a** und **4a** zeigte, dass der mono-Komplex **3a** vor der Aufnahme in die Zellen sehr wahrscheinlich einer Umlagerungs- oder Zersetzungsreaktion unterliegt, dies ist bei dem bis-Komplex **4a** nicht zu erkennen. Nach der Zellaufnahme muss es in beiden Fällen zu einer Trennung von dem fluorhaltigen Fragment vom Goldzentralatom kommen, da das Gold im Vergleich zum Fluor bei beiden Verbindungen **3a** und **4a** vermehrt aus den Zellen ausgeschleust wird.

4.2.4 Bestimmung der Lipophilie

Um das Potential einer neuen Verbindung für eine orale Applikation einschätzen zu können, hat Lipinski vom Pharmakonzern Pfizer im Jahre 1997 [299] in einer computerunterstützten Untersuchung die physikochemischen Eigenschaften von (potentiellen) Arzneistoffen analysiert, welche mindestens die Phase II der klinischen Studien erreicht hatten. Hierbei wurden aus der WDI (World Drug Index) Datenbank auf die Verbindungen zurückgegriffen, welche ebenfalls in der USAN (United States Adopted Name) oder der INN (International Non-proprietary Name) gelistet waren. Es hat sich herausgestellt, dass nur 10 % aller USAN Verbindungen einen log P Wert (ein Maß für die Lipophilie/Hydrophilie einer Verbindung) über 5 aufwiesen, nur 8 % mehr als fünf –NH und –OH Gruppen trugen, 12 % mehr als zehn Stickstoffe und Sauerstoffe enthielten und 11 % schwerer als 500 Daltons waren. Eine Abweichung in mehr als zwei Parametern lag unter 10 %. Daraus leiteten sich die „Rule of

Five“ (RO5) ab. Alle Parameter beinhalten den Faktor 5 oder ein Vielfaches von 5. Eine zweifache Abweichung in den Parametern gibt einen Hinweis auf ein schwaches Absorptions- oder Permeationsvermögen. Mit den RO5 konnten neue Verbindungen schon in einem frühzeitigen Entwicklungsstadium hinsichtlich ihres Potentials als neue oral applizierbare Arzneistoffe eingeschätzt werden.

Aus den mono-NHC Gold(I)komplexen und den bis-NHC Gold(I)komplexen dieser Arbeit wurden exemplarisch jeweils die drei strukturell verwandten Verbindungen **3a** – **3c** und **4a** – **4c** untersucht. Dafür wurden die log P Werte experimentell mit der Schüttelmethode in Kombination mit der Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt. Als Referenz dienten die Goldkomplexe Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2** und Auranofin **R1**, welcher als Ridaura® ein bereits zugelassenes orales Arzneimittel in der Therapie der rheumatoiden Arthritis darstellt.

Der log P Wert gibt Aufschluss über die Lipophilie oder Hydrophilie einer Verbindung. Hierbei wird die Verteilung der Substanzen zwischen dem polaren Lösemittel Wasser und dem unpolaren Lösemittel n-Octanol betrachtet. Über den berechneten Koeffizienten kann abgeschätzt werden, ob sich der potenzielle Arzneistoff eher im Fettgewebe einlagern oder im Zytosol der Zellen und dem Blut lösen würde. Der log P Wert ist ein wichtiger Parameter für die Pharmakokinetik und wird bei der Betrachtung des LADME (Liberation, Adsorption, Distribution, Metabolismus, Elimination) Schemas herangezogen. Die Werte werden wie folgt eingeteilt:

log P kleiner 0: Verbindung ist hydrophil, löst sich besser in Wasser als in Octanol

log P gleich 0: Verbindung verteilt sich gleichmäßig zwischen Wasser und Octanol

log P größer 0: Verbindung ist lipophil, löst sich besser in Octanol als in Wasser

Verbindung	Wasserstoff- donatoren	Wasserstoff- akzeptoren	Molekulargewicht (Dalton)	Log P (Wasser / PBS)
3a	0	2	450,06	2,36 ^{+/-0,60} / 4,35 ^{+/-0,40}
3b	0	2	511,60	2,79 ^{+/-0,38} / 4,55 ^{+/-0,48}
3c	0	2	432,70	2,06 ^{+/-0,15} / 3,68 ^{+/-0,16}
4a	0	4	760,42	1,36 ^{+/-0,01} / 4,34 ^{+/-0,34}
4b	0	4	882,23	1,26 ^{+/-0,08} / 4,10 ^{+/-0,32}
4c	0	4	724,44	1,21 ^{+/-0,03} / 3,83 ^{+/-0,46}
Auranofin R1	0	5	678,48	0,98 ^{+/-0,03} / 1,69 ^{+/-0,48}
Et ₃ PAuCl R2	0	0	350,58	0,98 ^{+/-0,01} / 1,56 ^{+/-0,71}

Tab. 8: Auswertung der „Lipinski-Parameter“ der verschiedenen Phenylimidzolderivate der mono- und bis-NHC Gold(I)komplexe 3a – 3c und 4a – 4c, als auch der goldhaltigen Referenzsubstanzen R1 und R2 einschließlich der experimentell ermittelten log P Werte. Die Werte wurden in einem Octanol/Wasser Gemisch (linker Wert; pH 7,0) und einem Octanol/Puffer Gemisch (rechter Wert; pH 7,4) bestimmt. Alle Parameterabweichungen von den RO5 wurden blau markiert

Bis auf den bromierten mono-NNHC Gold(I)komplex **3b**, entsprechen die restlichen getesteten Komplexe der mono-NHC Gold(I)komplexe **3a – 3c** vollständig den Parametern der RO5. Auch das Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2** erfüllt alle Kriterien. Bei den bis-NHC Gold(I)komplexen **4a – 4c** wird jeweils das Kriterium des Molekulargewichts nicht erfüllt. Wie auch bei der Referenz Auranofin **R1**, sind die Moleküle größer als 500 Dalton (Tab. 8). Dies ist nicht weiter verwunderlich und sollte nicht als Ausschlusskriterium betrachtet werden, da alleine das Gold im Vergleich zum Kohlenstoff eine ca. 16-fach größere Molekülmasse aufweist, das Molekül aber vom Volumen her nur geringfügig mehr Platz im Raum einnimmt. Alle getesteten Verbindungen hielten sich überwiegend in der Octanolphase auf, ihr lipophiler Charakter überwiegt damit dem hydrophilen. Es sind dennoch Unterschiede zwischen den Substanzklassen und auch innerhalb der Serien zu beobachten (Tab. 8).

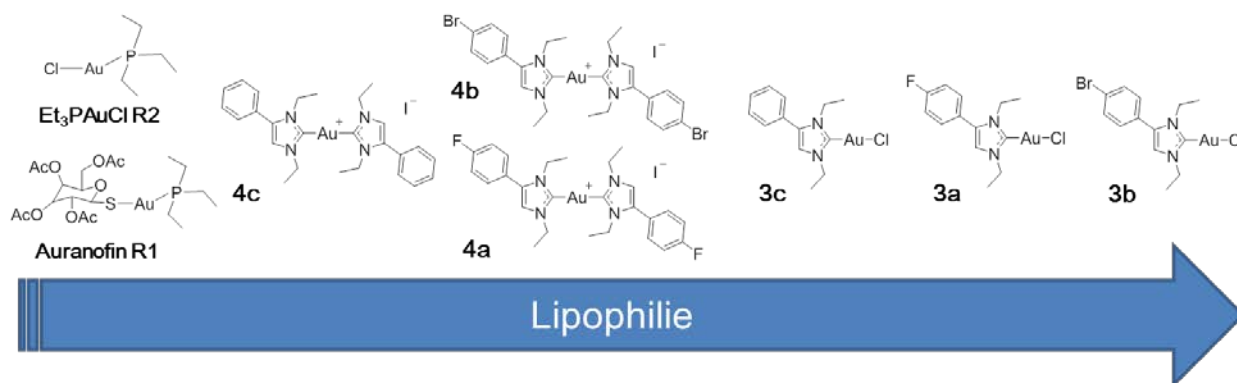


Abb. 55: Lipophilie der verschiedenen Substanzen der mono- und bis-NHC Gold(I) Komplexe und Goldreferenzen

Die mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** – **3c** stellen in diesen Versuchen die lipophilsten Verbindungen dar ($\log P_{7,0}$ 2,0 – 2,8; $\log P_{7,4}$ 3,7 – 4,6). Alle drei Komplexe haben eine geringe Zahl von Wasserstoffakzeptoren, das Chlorido(triethylphosphan)gold(I) wies unter allen getesteten Verbindungen die geringste Anzahl auf. Die Substitution mit Fluor (**3a**) und Brom (**3b**) zeigte im Vergleich zum unsubstituierten Komplex **3c** eine Steigerung der Lipophilie beim gleichen Grundkörper. Die bromierte Verbindung **3b** zeigte einen höheren log P Wert im Vergleich zum fluorierten Komplex **3a**.

Die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** – **4c** sind weniger lipophil als die mono-NHC Gold(I)komplexe ($\log P_{7,0}$ 1,2 – 1,4; $\log P_{7,4}$ 3,8 – 4,4). Sie tragen neben den großen lipophilen aromatischen Liganden mit vier Wasserstoffakzeptoren auch eine positive Ladung, welche sie in der Summe hydrophiler macht. Auch in dieser Gruppe sind die halogenierten Verbindungen **4a** und **4b** als lipophiler einzuordnen als der nicht halogenierte Komplex **4c**. Bei den beiden Verbindungen **4a** und **4b** liegen die log P Werte sehr dicht bei einander, daher wurden sie in der Darstellung der Lipophilieunterschiede (Abb. 56) als gleichwertig dargestellt.

Die hydrophilste Verbindung in diesem Test ist das neutrale Auranofin ($\log P_{7,0}$ 0,98; $\log P_{7,4}$ 1,69), welches aber die größte Anzahl von Wasserstoffakzeptoren aufweist.

Nach den RO5 erfüllen die Komplexe **3a**, **3c** und **R2** alle Kriterien vollständig. Alle anderen Verbindungen weichen in nur einem Parameter ab, darunter ist auch das bereits zugelassene Auranofin.

Alle Verbindungen gehen im Puffer/Octanol-Gemisch (pH 7,4) im Vergleich zum Wasser/Octanol-Gemisch (pH 7,0) mehr in die Octanolphase über. Dies führt zu etwas höheren log P Werten.

In Bezug zu den Ergebnissen der Zellaufnahmestudien kann nicht bestätigt werden, dass eine größere Lipophilie zu einer besseren Membranpermeation führt. Die Halogene steigern zwar die Lipophilie der Komplexe aber verringern die Zellaufnahme.

4.2.5 Photometrische Stabilitätsuntersuchungen von mono-NHC Komplexen

Von den mono-NHC Gold(I)komplexen **3a** – **3c** wurde die Stabilität der Komplexe über einen Zeitraum von 8 Stunden photometrisch bestimmt. Dazu wurden die Verbindungen in DMF gelöst, mit DMEM Zellkulturmedium (ohne Farbindikator) verdünnt und sofort vermessen.

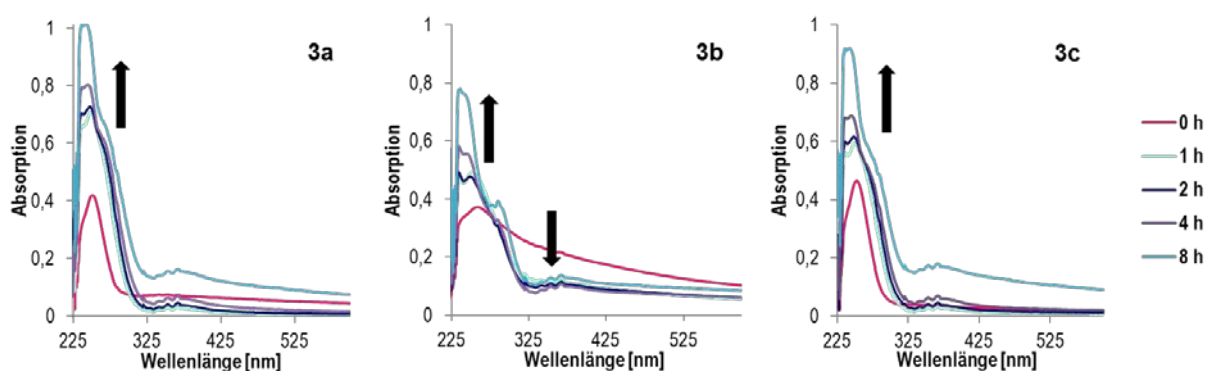


Abb. 56: Zeitabhängige photometrische Messungen der mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** – **3c** (Konzentration bei allen Verbindungen zu Beginn der Messungen: 50 μ M)

Die Proben wurden über den Versuchszeitraum bei einer Temperatur von 37 °C im Brutschrank inkubiert. (Abb. 57). Die Inkubationskonzentration der Verbindungen betrug

50 μM mit einer DMF Konzentration von 0,1 % (v/v). Bei allen drei mono-NHC Gold(I)komplexen **3a** (λ_{max} 252 nm), **3b** (λ_{max} 259 nm) und **3c** (λ_{max} 252 nm) erhöht sich die Absorption und gleichzeitig ist eine hypsochrome Verschiebung des Maximums für **3a** und **3c** (auf λ_{max} 248 nm) und eine bathochrome Verschiebung für **3b** (auf λ_{max} 261 nm) zu erkennen. Dabei bildet sich bei allen drei Verbindungen eine zweite Schulter bei 268 nm aus. Die Änderungen des Spektrums sind ein Hinweis dafür, dass die Komplexe nicht stabil sind und sich bereits innerhalb der ersten Stunde anfangen zu zersetzen oder umzulagern. Der Prozess führt sich über den gesamten Versuchszeitraum von 8 Stunden weiter fort.

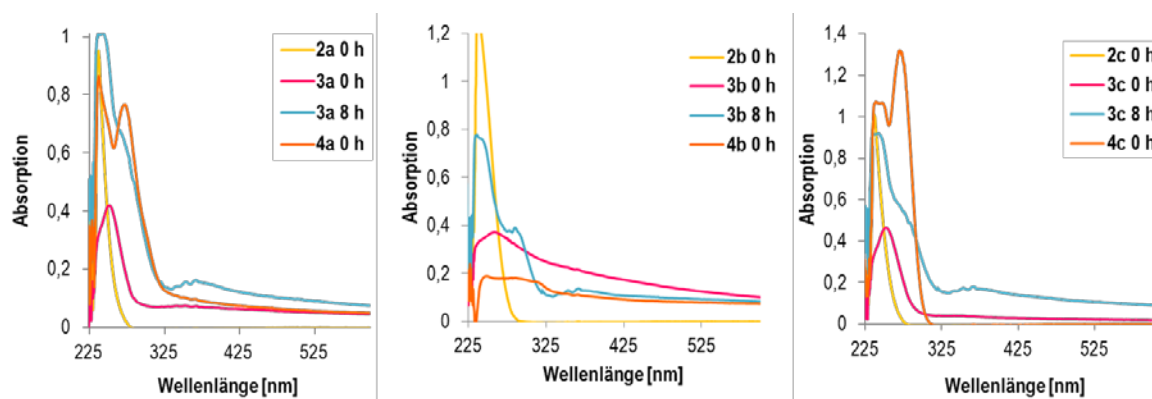


Abb. 57: Vergleich der mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** – **3c** zu Beginn des Versuchs und nach 8 Stunden mit den Spektren der jeweiligen Liganden **2a** – **2c** und den bis-NHC Gold(I)komplexen **4a** – **4c** (Konzentration für alle Verbindungen: 50 μM)

Zum Vergleich wurden für die entsprechenden Liganden **2a** – **2c** und die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** – **4c** Referenzspektren aufgenommen (Abb. 58). Alle drei Liganden **2a** – **2c** zeigen ein Absorptionsmaximum bei 237 nm. Die Verbindungen **4a** und **4c** der bis-NHC Gold(I)komplexe weisen ebenfalls ein Absorptionsmaximum bei 237 nm auf und zeigen dazu noch eine Schulter mit einem Absorptionsmaximum bei 272 nm. Für Komplex **4b** ist der Peak sehr breit und flach, das Maximum liegt daher im Bereich von 236 – 288 nm. Die Unterschiede der UV/VIS-Spektren der Liganden und bis-NHC Gold(I)komplexe liegen darin, dass die Komplexe **4a** und **4c** eine zusätzliche Schulter ausbilden und sich der Komplex **4b**

stark verbreitert und die Intensität abflacht. Da eine Schulterbildung bei allen drei mono-NHC Gold(I)komplexen **3a** – **3c** zu erkennen ist und das erste Absorptionsmaximum nach 8 Stunden bei 248 nm genau zwischen den Wellenlängen der Absorptionsmaxima der mono-NHC Gold(I)komplexe bei 252 nm und denen der bis-NHC Gold(I)komplexe bei 237 nm liegt, könnte dieses entstandene Signal durch eine Überlagerung entstanden sein, welche sich im Laufe des Umlagerungsprozesses zum bis-NHC Gold(I)komplex ergibt.

Die Daten geben somit den Hinweis, dass die mono-NHC Gold(I)komplexe sich eher zu den entsprechenden bis-NHC Gold(I)komplexen umlagern, als dass sie nur ihre NHC-Liganden abspalten. Genauere Untersuchungen durch die Entwicklung von geeigneten Methoden für diese neutralen Metallkomplexe sind erforderlich um diese These zu überprüfen.

4.2.6 LC-MS(ESI) Stabilitätsuntersuchungen von bis-NHC Komplexen

Im Gegensatz zu den neutralen Strukturen, wie den mono-NHC Gold(I)komplexen, eignet sich für kationische Verbindungen vor allem die LC-MS Technik. Hiermit können die positiv geladenen Liganden und Metallkomplexe auf einer RP18-Säule gut getrennt werden und sind durch die Kopplung mit einer ESI-Quelle eindeutig identifizierbar. Somit war es möglich eine effektive Methode zu entwickeln, mit der Stabilitätsstudien in verschiedenen Matrices durchgeführt werden konnten. Im Gegensatz zu den photometrischen Messungen (Kapitel 4.2.5) können hier die Verbindungen unter den Peaks einer bestimmten Masse zugeordnet werden und Abbauprodukte identifiziert werden.

4.2.6.1 Methodenentwicklung

Für die Methodenentwicklung wurden verschiedene Fließmittelzusammensetzungen ausgewählt. Es wurden Acetonitril/Ammoniumpuffer(mit 0,02 % Ameisensäure)-Gemische als auch Acetonitril/Wasser-Gemische mit den Zusammensetzungen 90/10, 85/15, 80/20, 75/25 und 70/30 verwendet. Ein hoher Acetonitrilanteil führte zu kurzen Retentionszeiten und

schmalen Peaks, mit einer guten Auflösung des Liganden und Komplexpeaks. Daher wurde für die weitere Entwicklung das Verhältnis 90/10 beibehalten. Die Laufzeit konnte mit diesen Bedingungen auf 6 Minuten gesetzt werden. Bei einem Austausch von Puffer gegen Wasser im gleichen Konzentrationsverhältnis, konnten keine Peaks bis zu einer Laufzeit von 20 Minuten detektiert werden.

Neben der isokratischen Elution wurde ebenfalls ein Gradient getestet (90:10 zu 50:50). Bei der Gradientenelution zeigte sich ebenfalls eine Verbreiterung der Peaks, das verstärkte Auftreten von Tailings und eine Verlängerung der Laufzeit.

Im letzten Schritt wurde das Injektionsvolumen angepasst. Es wurden die Injektionsvolumina von 0,1 µL, 1 µL, 2 µL, 5 µL und 10 µL untersucht. Je geringer das Volumen, und damit die Menge der aufgetragenen Substanzen, desto besser ist die Auflösung der Peaks. Als bester Kompromiss stellte sich das Injektionsvolumen von 2 µL heraus. Bei diesen Messungen konnten schmale Peaks mit einem sehr geringen Tailing aber einer ausreichenden Intensität erbracht werden. Über die Aufnahme von Absorptionskurven wurde für die folgenden Experimente die Wellenlänge von 240 nm ausgewählt, da hier alle Verbindungen ein Absorptionsmaximum aufwiesen, dessen Intensitäten miteinander vergleichbar waren.

4.2.6.2 Stabilitätstests der kationischen Verbindungen **2a** und **4a**

Die Stabilitätstests wurden in allen verwendeten versuchsrelevanten Matrices der bereits beschriebenen Experimente durchgeführt. Dazu gehörten destilliertes Wasser, PBS Puffer (pH 7,4), Zellkulturmedium DMEM ohne Gentamycin/FCS, n-Octanol, DMF und DMSO. Die Stabilitätsuntersuchungen wurden exemplarisch für das geladene fluoridierte Phenylimidazoliumiodid **2a** und den bis-NHC Gold(I)komplex **4a** bei 37 °C (Körpertemperatur) über einen Zeitraum von vier Tagen durchgeführt. Zur Detektion der HPLC Messungen, wurde die Apparatur mit einer ESI-Quelle gekoppelt. Somit konnten alle

Peaks einwandfrei durch den DAD quantifiziert werden und gleichzeitig über die Massenspektrometrie identifiziert werden.

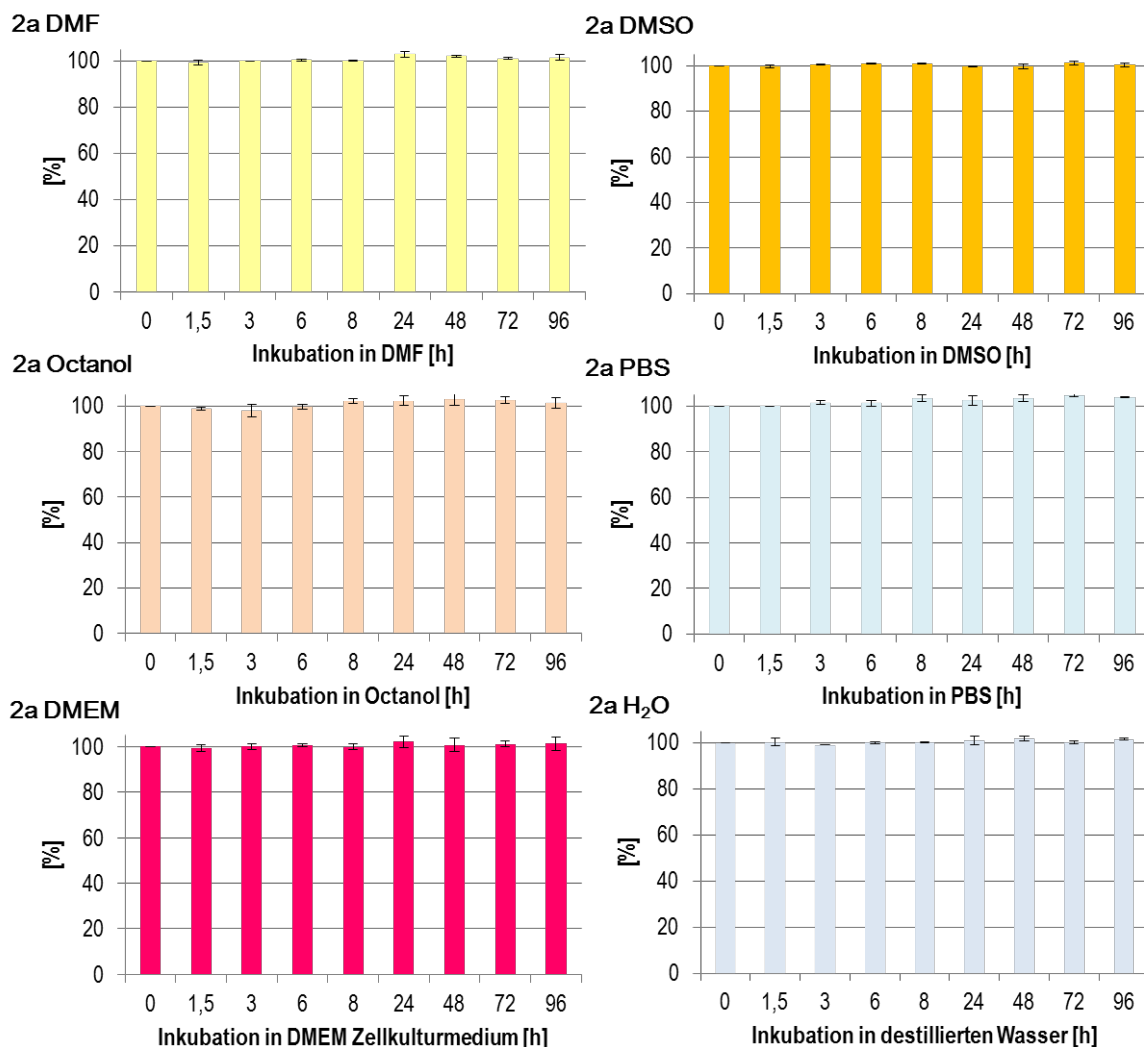


Abb. 58: Darstellung der Stabilität des fluorierten Phenylimidazoliumiodids **2a** in verschiedenen Matrices über einen Zeitraum von vier Tagen. Die Substanz wurde in DMF mit einer Konzentration von 100 mM gelöst und in den entsprechen organischen Matrices auf 1 mM verdünnt, die Testlösungen hatten eine DMF Konzentration von 1 % [v/v], nur in reinem DMF betrug die Konzentration 100 % [v/v].

In den Matrices DMF, DMSO, n-Octanol, PBS Puffer, DMEM Zellkulturmedium und Wasser war das fluorierte Phenylimidazoliumiodid **2a** war über vier Tage stabil (Abb. 59). Die Quantifizierung der Peakflächen ergab für alle Messwerte Prozentzahlen zwischen 98 % und

102 % mit geringen Standardabweichungen. Die Messwerte über 100 % ergaben sich aus einer geringen Verdunstung des Lösemittels während der Inkubation.

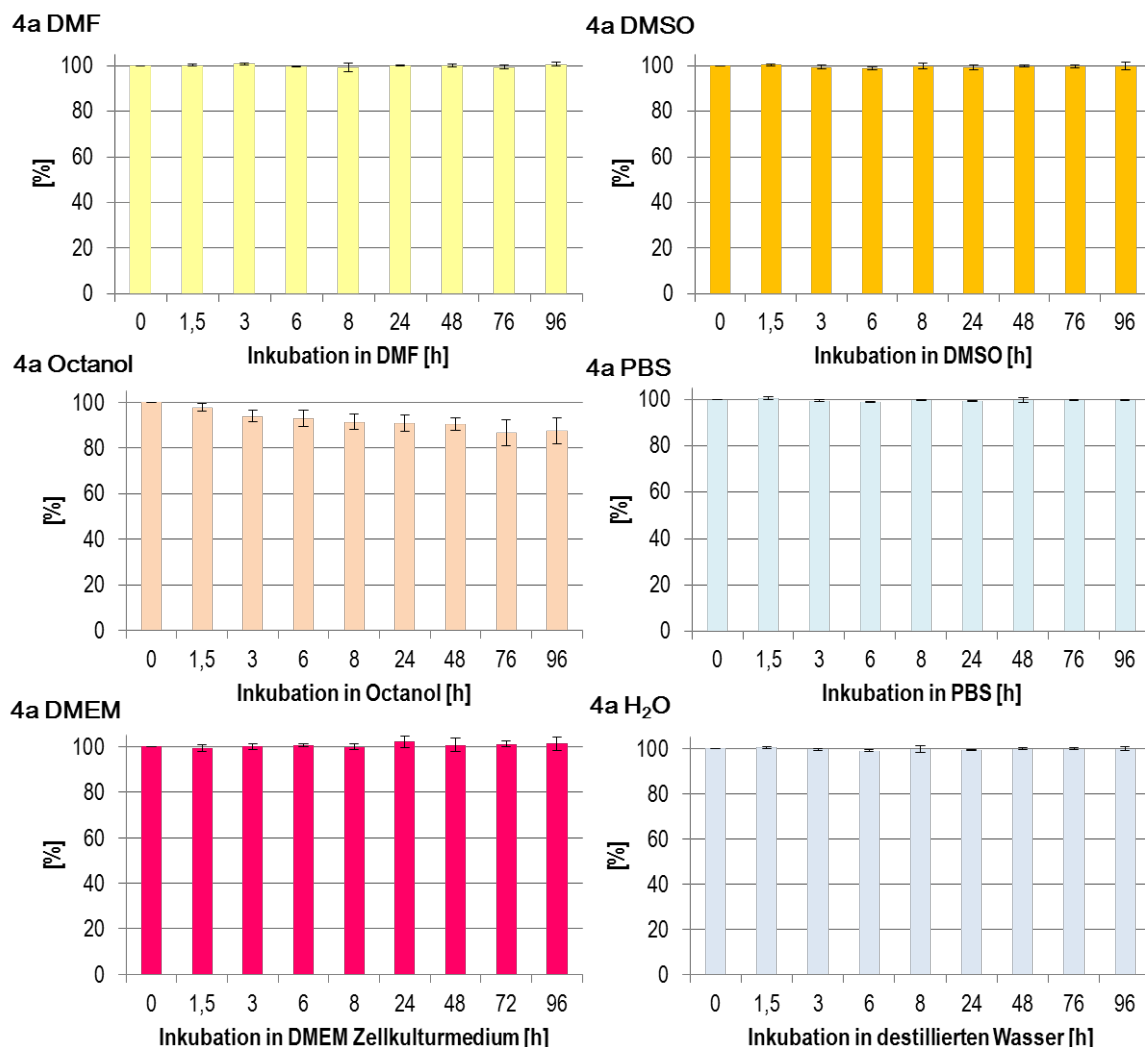


Abb. 59: Darstellung der Stabilität des fluorierten Phenylimidazol bis-NHC Komplex 4a in verschiedenen Matrices über einen Zeitraum von vier Tagen. Die Substanz wurde in DMF mit einer Konzentration von 100 mM gelöst und in den entsprechenden organischen Matrices auf 1 mM verdünnt, die Testlösungen hatten eine DMF Konzentration von 1 % [v/v], in reinem DMF betrug die Konzentration 100 % [v/v]. Aufgrund der schlechten Löslichkeit in wässrigen Lösungen wurde für die Versuche im PBS, DMEM und Wasser der DMF-Anteil auf 50 % [v/v] erhöht.

Die Stabilitätstests des bis-NHC Gold(I)-Komplexes **4a** zeigen, dass dieser außer in n-Octanol, in allen Matrices über 4 Tage stabil ist. Nach 96 Stunden sind in dem langkettigen Kohlenwasserstoff im Durchschnitt noch 88 % des Ausgangsgehalts vorhanden. (Abb. 60)

In den dazugehörigen Chromatogrammen ist neben dem Peak des Kations von Komplex **4a** ($[M-I]^+$, m/z 633,2 bei 2,69 Minuten) die Bildung eines weiteren Peaks (m/z 219,1 bei 1,11 Minuten) über den Versuchszeitraum beobachtet worden. Durch die MS-ESI Messungen konnte der neu entstandene Peak eindeutig dem Kation des Liganden **2a** $[M-I]^+$ zugeordnet werden (Abb. 61). Weitere Peaks von Abbauprodukten waren bei den Messungen nicht zu erkennen.

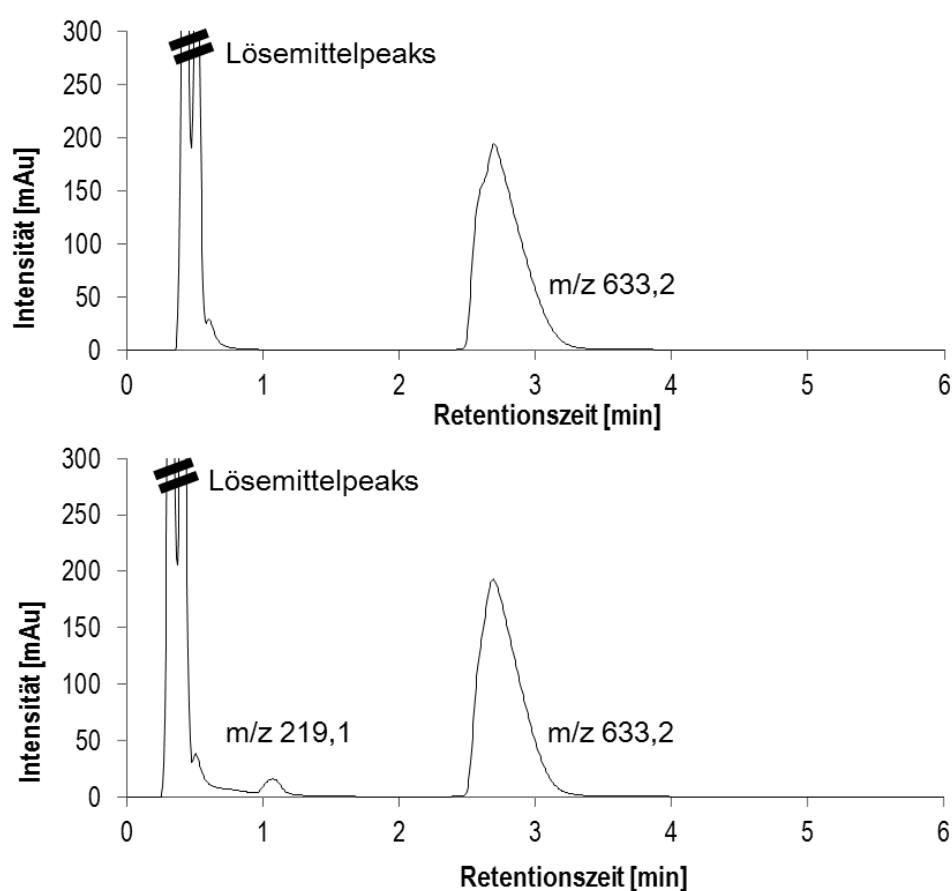


Abb. 60: Chromatogramme des bis-NHC Gold(I)komplexes **4a** in DMF angelöst und n-Octanol verdünnt: nach sofortiger Messung (oben) und nach einer Inkubation von 96 Stunden (unten), m/z 219,1 entspricht dem Kation $[M-I]^+$ von **2a**, m/z 633,2 entspricht dem Kation $[M-I]^+$ von **4a**

4.3 Enzyminhibition der Thioredoxinreduktase von Säugetieren

Zur Bestimmung der enzyminhibitorischen Aktivität der verschiedenen Verbindungen wurde eine kommerziell erworbene Säugetier-Thioredoxinreduktase (TrxR) verwendet, welche aus der Rattenleber isoliert wurde.

Im verwendeten Assay wurde das natürliche Substrat Thioredoxin (Trx) gegen die farblose Substanz 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) ausgetauscht. Diese Verbindung besitzt ebenfalls eine Disulfidbrücke, welche durch das Enzym TrxR katalytisch gespalten werden kann. Diese Reaktion ist anhängig vom Cofaktor NADPH, welcher die Elektronen für die Redoxreaktion liefert und dem Reaktionsansatz beigelegt wird. Dabei entsteht das gelbgefärbte TNB (2-Nitro-5-thiobenzoat), welches photometrisch erfasst werden kann (Abb. 62). Über den Anstieg der TNB Konzentration, und der damit einhergehenden Absorptionsänderung, lassen sich in Bezug zu einer Positivkontrolle die halbmaximalen Hemmkonzentrationen (IC_{50} Werte) der verschiedenen Verbindungen bestimmen.

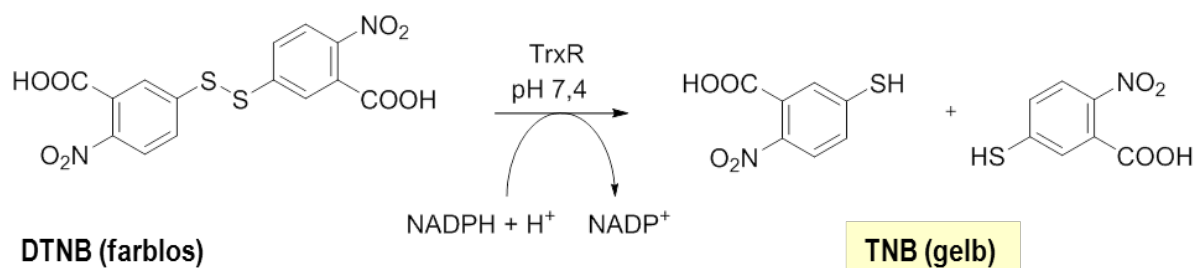


Abb. 61: Katalytische Disulfidspaltung der Säugetier-Thioredoxinreduktase des DTNBs

Getestet wurden das Phenylimidazol **1a**, die (Benz)Imidazoliumiodide **2a – 2h**, die mono-NHC Komplexe **3a – 3h**, die bis-NHC Komplexe **4a – 4e** als auch die Referenzsubstanzen **R1 – R4**. Aus jeder Serie der mono- und bis-NHC Komplexe wurde exemplarisch an einer Verbindung überprüft, ob verschiedene Lösemittel als Stammlösungen eingesetzt (DMF,

DMSO und Wasser) einen Einfluss auf die Aktivität der Substanzen haben. Im Versuch wurden jeweils Stammlösungen der Substanzen mit den entsprechenden Lösemitteln hergestellt und anschließend mit PBS Puffer verdünnt. Die Ergebnisse der Experimente der verschiedenen Substanzklassen wurden als IC₅₀ Werte berechnet und tabellarisch zusammengefasst.

4.3.1 Phenylimidazol und (Benz)Imidazoliumiodide

Das neutrale Phenylimidazol **1a** und das kationische Phenylimidazoliumiodid **2a** wurden bis zu einer Konzentration von 200 µM getestet. Beide organische Verbindungen zeigten keinen Einfluss auf die Enzymaktivität der TrxR. Es konnten ebenfalls keine Aktivitätsunterschiede festgestellt werden, wenn die Stammlösungen der Verbindungen aus den verschiedenen Lösemitteln hergestellt wurden. Verbindung **2a** konnte in Wasser nicht vollständig gelöst werden. Alle weiteren kationischen (Benz)Imidazoliumiodide **2b** – **2h** zeigten keine Aktivitätsminderung bis zu einer Konzentration von 100 µM in DMF (Tab. 9).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	TrxR mamm. IC ₅₀ [µM]
Phenylimidazol	1a	DMF	> 200
Phenylimidazol	1a	DMSO	> 200
Phenylimidazol	1a	H ₂ O	n.l.
Phenylimdazoliumiodid	2a	DMF	> 200
Phenylimdazoliumiodid	2a	DMSO	> 200
Phenylimdazoliumiodid	2a	H ₂ O	> 200
(Benz)Imidazoliumiodide	2b – 2g	DMF	> 100

Tab. 9: IC₅₀ Werte der Enzyminhibitionstests in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lösemitteln (n = 3); n.l. = nicht löslich bis 525 µM

4.3.2 Mono-NHC Gold(I)komplexe

Nach der Koordination der rein organischen (Benz)Imidazoliumiodide an das Gold wurden für die neutralen mono-NHC Komplexe **3a** – **3h** IC₅₀ Werte im unteren bis mittleren nanomolaren Bereich (38 – 361 nM) bestimmt (Abb. 63). Die Hemmung fiel bei den nicht halogenierten Komplexen **3c**, **3e** und **3h** am geringsten aus und lag zwischen 202 – 361 nM. Die halogenierten Verbindungen zeigten hingegen IC₅₀ Werte im Bereich von 38 – 174 nM (Tab. 10).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	TrxR mamm. IC ₅₀ [μM]
FPhIm-Au-Cl	3a	DMF	0,174 ^{+/-0,027}
FPhIm-Au-Cl	3a	DMSO	0,320 ^{+/-0,024}
FPhIm-Au-Cl	3a	H ₂ O	n.l.
BrPhIm-Au-Cl	3b	DMF	0,098 ^{+/-0,020}
HPhIm-Au-Cl	3c	DMF	0,244 ^{+/-0,049}
BrIm-Au-Cl	3d	DMF	0,038 ^{+/-0,010}
HIm-Au-Cl	3e	DMF	0,209 ^{+/-0,059}
FBeIm-Au-Cl	3f	DMF	0,043 ^{+/-0,002}
BrBeIm-Au-Cl	3g	DMF	0,042 ^{+/-0,006}
HBeIm-Au-Cl	3h	DMF	[274] 0,361 ^{+/-0,040}

Tab. 10: IC₅₀ Werte der Enzyminhibitionstests in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lösemitteln (n = 3); n.l. = nicht löslich bis 525 μM

Hierbei waren die Komplexe mit den großen Phenylimidazolliganden **3a** und **3b** (98 – 174 nM) am schwächsten, die Verbindungen mit den Benzimidazolliganden **3f** und **3g** (42 – 43 nM) befanden sich im mittleren Bereich und die Substanz mit den kleinsten Imidazolliganden **3d** wies mit 38 nM die höchste Aktivität auf (Abb.63). Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass die jeweiligen Bromderivate im Vergleich zu den entsprechenden Fluorderivaten des gleichen Grundkörpers aktiver waren. Die Größe des Grundkörpers hat in diesen Tests insgesamt einen größeren Einfluss auf die Aktivität der Komplexe ausgemacht,

als die unterschiedlichen Halogensubstitutionen der Grundkörper. Für Komplex **3a** konnten Stammlösungen mit DMF und in DMSO hergestellt und getestet werden.

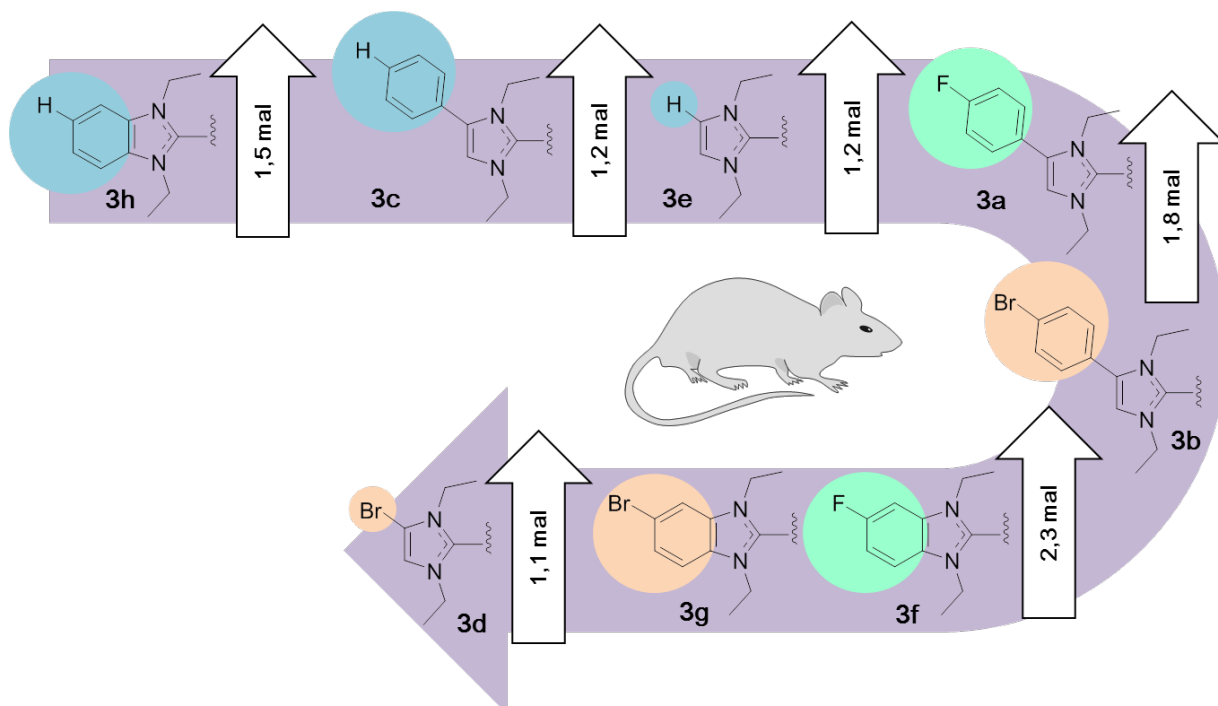


Abb. 62: Aktivitätssteigerungen der Serie mit der Grundstruktur NHC-Au-Cl entsprechend der Komplexe **3a** – **3h** abhängig von der Substitution des (Benz)Imidazolrings an der Säugetier-TrxR (es wurde hier nur der NHC-Teil der Komplexe dargestellt)

In Wasser zeigte die Verbindung keine ausreichende Löslichkeit. Die Hemmung wurde bei der Verwendung von DMSO um das 1,8-Fache erniedrigt im Vergleich zu DMF.

4.3.3 Bis-NHC Gold(I)komplexe

Eine weitere Umsetzung der mono-NHC Gold(I)komplexe zu den entsprechenden symmetrischen kationischen bis-NHC Gold(I)komplexen **4a** – **4e** spiegelte sich in einer teils sehr starken Abnahme der Inhibition wieder (Tab. 11).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	TrxR mamm. IC ₅₀ [μM]
FPhIm-Au ⁺ -FPhIm I ⁻	4a	DMF	0,723 ^{+/-0,034}
FPhIm-Au ⁺ -FPhIm I ⁻	4a	DMSO	0,823 ^{+/-0,028}
FPhIm-Au ⁺ -FPhIm I ⁻	4a	H ₂ O	n.l.
BrPhIm-Au ⁺ -BrPhIm I ⁻ *	4b	DMF	16,25 ^{+/-3,20}
HPhIm-Au ⁺ -HPhIm I ⁻	4c	DMF	30,29 ^{+/-4,63}
BrIm-Au ⁺ -BrIm I ⁻	4d	DMF	71,92 ^{+/-5,39}
HIm-Au ⁺ -HIm I ⁻	4e	DMF	127,78 ^{+/-6,07}

Tab. 11: IC₅₀ Werte der Enzyminhibitionstests in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lösemitteln (n = 3); n.l. = nicht löslich bis 525 μM; *Lösung wird bei der Verdünnung von DMSO mit PBS Puffer leicht milchig, ohne jedoch (auch nach längerem Stehenlassen) einen sichtbaren Niederschlag zu bilden

Die IC₅₀ Werte zeigten innerhalb der bis-Komplexgruppe eine sehr große Varianz von Aktivitäten im submikromolaren bis oberen mikromolaren Bereich (0,723 μM – 127,78 μM) und waren damit ca. 4- bis 1893-mal schwächer im Vergleich zu den jeweiligen mono-NHC Gold(I)komplexpendants (geringste Aktivitätsabnahme **4a** / stärkste Aktivitätsabnahme **4d**) (Abb. 64). Der bis-NHC Gold(I)komplex **4a** wurde mit Stammlösungen aus DMF und DMSO untersucht. Die Aktivität in DMSO war nur geringfügig niedriger.

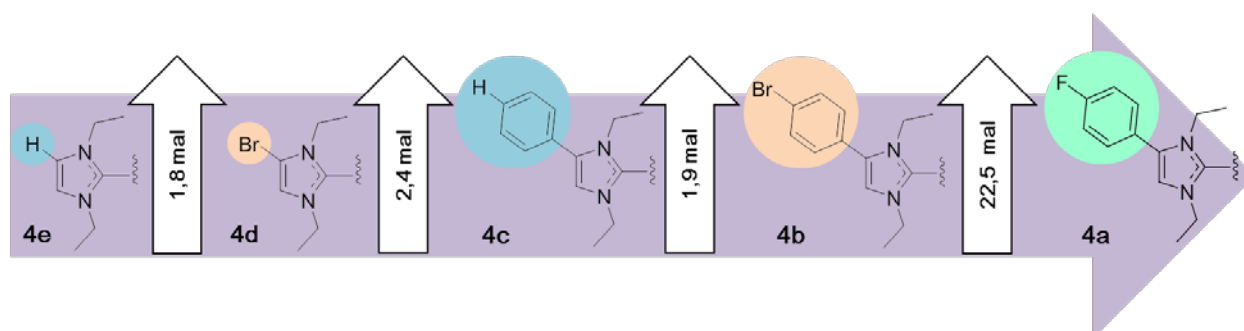


Abb. 63: Aktivitätssteigerungen der Serie mit der Grundstruktur NHC-Au-NHC⁺ I⁻ entsprechend der Komplexe **4a** – **4e** abhängig von der Substitution des Imidazolrings an der Säugetier- TrxR (es wurde hier nur der NHC-Teil der Komplexe dargestellt)

4.3.4 Goldhaltige Referenzen

Zu Referenzbestimmungen wurden der Goldkomplex Auranofin **R1**, das Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2** und die beiden Goldsalze AuCl **R3** und AuCl₃ **R4** herangezogen (Tab. 12). Die Goldkomplexe **R1** und **R2** erzielten in einer DMF-Stammlösung Ergebnisse im unteren nanomolaren Bereich (33 – 93 nM). Somit waren ihre Aktivitäten vergleichbar mit denen der aktivsten mono-NHC Gold(I)komplexe **3d**, **3g**, **3h** und **3b**. Wurde das Lösemittel DMF gegen DMSO ausgetauscht, zeigte dies keinen signifikanten Effekt. In Wasser waren die beiden Referenzen Auranofin **R1** und Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2** in den benötigten Konzentrationen nicht löslich.

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	TrxR mamm. IC ₅₀ [μM]
Auranofin	R1	DMF	0,093 ^{+/-0,009}
Auranofin	R1	DMSO	0,114 ^{+/-0,012}
Auranofin	R1	H ₂ O	n.l.
Et ₃ PAu-Cl	R2	DMF	0,033 ^{+/-0,005}
Et ₃ PAu-Cl	R2	DMSO	0,033 ^{+/-0,002}
Et ₃ PAu-Cl	R2	H ₂ O	n.l.
AuCl*	R3	DMF	0,128 ^{+/-0,034}
AuCl	R3	DMSO	0,129 ^{+/-0,036}
AuCl (sofort) *	R3	H ₂ O	0,953 ^{+/-0,023}
AuCl (nach 60 min) **	R3	H ₂ O	0,992 ^{+/-0,053}
AuCl ₃	R4	DMF	0,065 ^{+/-0,020}
AuCl ₃	R4	DMSO	0,071 ^{+/-0,015}
AuCl ₃	R4	H ₂ O	0,169 ^{+/-0,053}

Tab. 12: IC₅₀ Werte der Enzyminhibitionstests in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lösemitteln (n = 3); n.l. = nicht löslich bis 525 μM; *Präzipitation als schwarzer Niederschlag nach längerem Stehenlassen der Probe sichtbar, noch als Lösung vor dem Ausfallen aufgetragen; **Präzipitation als schwarzer Niederschlag nach längerem Stehenlassen der Probe sichtbar, als Suspension aufgetragen

Die Testung der beiden Goldsalze **R3** und **R4** konnten mit drei verschiedenen Stammlösungen (in DMF, DMSO und Wasser) durchgeführt werden. AuCl **R3** war zu Beginn der Tests komplett gelöst, nach einiger Zeit fiel jedoch in den Lösemitteln DMF und Wasser ein schwarzer Feststoff aus. Mit DMSO traten diese Effekte während der Versuchsdurchführung nicht auf. Die IC₅₀ Werte lagen bei der Verwendung von DMF und DMSO bei 128 nM und in Wasser bei 953 – 992 nM (7,5-fach höhere Werte im Vergleich zu den organischen Lösemitteln). Wenn die Substanz sofort nach dem Lösen getestet wurde, war die Aktivität höher, als wenn die Probe nach einer Stunde Wartezeit verwendet wurde (Tab. 12).

Auch das Salz AuCl₃ **R4** zeigte vergleichbare IC₅₀ Werte in der Testung mit DMF (65 nM) und DMSO (71 nM), war aber im Vergleich zu der Aktivität von AuCl **R3** ungefähr doppelt so potent. Trotz der guten Löslichkeit in allen drei Lösungsmitteln, sank die Aktivität mit einer wässrigen Stammlösung auf 169 nM ab.

4.3.5 Zusammenfassung

Die mono-NHC Komplexe **3a** – **3h** stellen die aktivsten Verbindungen dieser Testreihe dar. Ihre IC₅₀ Werte liegen im unteren nanomolaren Bereich. Auch das Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2** zeigt eine vergleichbar starke Inhibition der TrxR. Die Strukturen ähneln sich durch die Koordination eines Chloridoliganden und der linearen Geometrie. Eine ebenfalls vergleichbare Inhibition wies das AuCl₃ **R4** und das Auranofin **R1** auf. Das AuCl **R3** war unter den Referenzen die am wenigsten potente Substanz. Die geringsten inhibitorischen Effekte auf die TrxR zeigten die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** – **4e** mit einer sehr großen Varianz innerhalb der Serie.

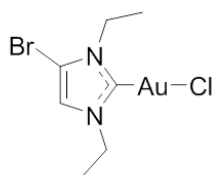
4.4 Apoptoseinduktion in Nalm-6 Zellen

Die Zellzyklus-Analyse wurde von Dr. Rainer Misgeld im Arbeitskreis von Dr. Dr. Aram Prokop am Institut der Experimentellen Onkologie im Kinderkrankenhaus Köln, Amsterdamer Straße 59, 50735 Köln, Deutschland durchgeführt.

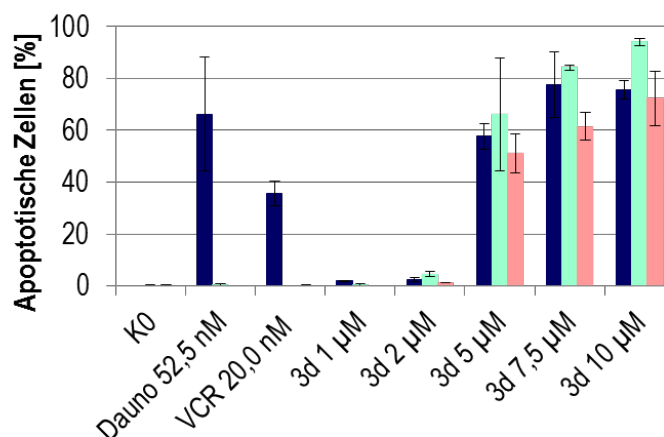
Die Induzierung der Apoptose wurde in der humanen (B-Zellvorläufer) Leukämiezelllinie Nalm-6 getestet. Zytostatika, wie der DNA-Interkalator Daunorubicin (DNR) und der Mitosehemmstoff Vincristin (VCR), werden häufig in der Kombinationstherapie bei der akuten Leukämie eingesetzt. Viele Tumorzellen bilden häufig Resistenzen gegen Zytostatika aus, welche auf den effektiven Efflux durch das membranständige P-glycoprotein (P-gp) zurückzuführen sind. [300] Daher wurden die Verbindungen **3d** und **4d** ebenfalls in einer DNR-resistenten Nalm-6 Zelllinie, als auch in einer VCR-resistenten Nalm-6 Zelllinie getestet. In den beiden resistenten Zelllinien wird der Effluxtransporter P-gp überexprimiert. Somit kann herausgefunden werden, ob die Resistenzentwicklung dieser Zellen auch Auswirkungen auf die Aktivität der neuen NHC-Gold(I)komplexe zeigt und Rückschlüsse gezogen werden, ob die Verbindungen Substrate des P-glykoproteins sind.

Bei dem mono-NHC Komplex **3d** ist eine Apoptoseinduktion bis zu der niedrigsten Testkonzentration von 1 μM zu erkennen. Der Komplex führt alle drei Nalm-6 Zelllinien ungefähr gleich stark in die Apoptose, wobei zwischen 2 μM und 5 μM ein großer Anstieg zu erkennen ist. Bei den Referenzen Daunorubicin, als auch Vincristin, sind nur bei den Zellen des Wildtyps apoptotische Zellen zu erkennen. Die vergleichbare Wirkung auf alle drei Subtypen der Nalm-6 Zellen spricht dafür, dass die Verbindung **3d** kein Substrat des P-glycoproteins ist und damit die Resistenz durchbrechen kann.

3d



■ Nalm-6
■ Nalm-6 DNR resistant
■ Nalm-6 VCR resistant



4d

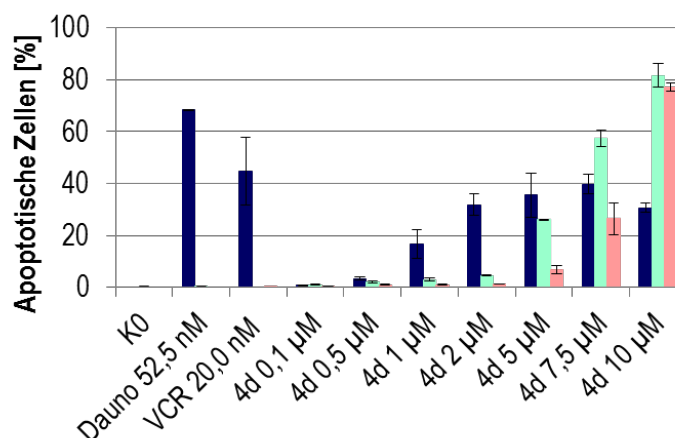
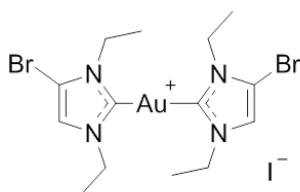


Abb. 64: DNA Fragmentierung nach 72 Stunden als Maß für die Apoptoseinduktion der Goldkomplexe 3d und 4d in Nalm-6 Zellen vom Wildtyp als auch den resistenten Nalm-6 Zellen

Der bis-NHC Komplex **4d** zeigt schon ab der geringsten Testkonzentration 0,1 µM in allen drei Zelllinien eine apoptotische Wirkung. Bis zu einer Konzentration von 5 µM werden verstärkt die Zellen des Wildtyps in die Apoptose geleitet. Ab einer Konzentration von 7,5 µM ist eine stärkere Wirkung auf die resistenten Zelllinien im Vergleich zum Wildtyp festzustellen. (Abb. 65). Im Vergleich zu den Referenzen Daunorubicin und Vincristin kann auch dieser Komplex die Resistenz überwinden. Nach diesen Ergebnissen ist auch der bis-NHC Gold(I)komplex **4d** kein Substrat des P-gp Transporters.

Der mono-NHC Gold(I)komplex **3d** ist potenter als der bis-NHC Gold(I)komplex **4d**.

5 Gold(I) *N*-heterozyklische Carben Komplexe als potentielle Antibiotika

5.1 Bakterielle Wachstumshemmung im Mikroboullion-Verdünnungstest

Der Mikroboullion-Verdünnungstest wurde von Bianka Karge im Arbeitskreis von Dr. Mark Brönstrup am Institut für Chemische Biologie des Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Deutschland durchgeführt.

Die MIC Werte (Minimal Inhibitory Concentration) wurden über eine Standardmethode des Mikroboullion-Verdünnungstest (broth dilution test) [301, 302] ermittelt und geben Aufschluss über die minimale Konzentration, bei welcher 99,9 % der inoulierten Keime über einen vorgegebenen Zeitraum abgetötet werden. Beim Mikroboullion-Verdünnungstest werden die Versuche im Kleinstansatz mit einer vorgegebenen Dichte von keimbildenden Einheiten pro Milliliter auf Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Endpunktbestimmung erfolgt photometrisch.

Verbindung	<i>A. baumannii</i> ⊖	<i>E. cloacae</i> ⊖	<i>E. coli</i> ⊖	<i>K. pneumoniae</i> ⊖
Auranofin	>73,58*	>73,58*	>73,58*	>73,58*
Antibiotikum	2,41 ^{+/-0,42***}	0,24 ^{+/-0,09***}	<0,15	0,54 ^{+/-0,18}
3a	>100	100 ^{+/-0,00}	100,00 ^{+/-0,00}	75,00 ^{+/-25,01}
3b	>100	>100	>100	>100
3c	>100	100 ^{+/-0,00***}	>100	>100
3d	>100	66,66 ^{+/-16,67}	83,33 ^{+/-16,67}	83,33 ^{+/-16,67}
3e	>100	37,49 ^{+/-7,21***}	37,49 ^{+/-12,51**}	41,67 ^{+/-8,33}
3f	>100	>100	>100	>100
3g	>100	66,67 ^{+/-16,66}	83,33 ^{+/-16,66}	>100
3h	>100	100 ^{+/-0,00**}	>100	>100

Tab. 13: MIC Werte in µM der mono-NHC Komplexe 3a – 3h auf verschiedenen Bakterienstämmen

Als Positivkontrolle wurden die Antibiotika Amikacin (*P. aeruginosa*), Linezolid (*S. aureus*), und Ciprofloxacin (für alle anderen Stämme) eingesetzt. n=3; *n=1, **n=2, ***n=4; MIC = minimale inhibitorische Konzentration; MRSA = Methicillin-resistanter *Staphylococcus aureus*; ⊕ = grampositiv; ⊖ = gramnegativ.

Verbindung	<i>P. aeruginosa</i> ⊖	<i>E. faecium</i> ⊕	MRSA1 ⊕	MRSA2 ⊕
Auranofin	>73,58*	18,40*	2,30 ^{+/-0,00**}	2,30*
Antibiotikum	11,05 ^{+/-2,51}	> 15,09	4,83 ^{+/-4,65**}	2,02 ^{+/-0,59***}
3a	>100	12,49 ^{+/-0,00}	6,28 ^{+/-0,00**}	7,30 ^{+/-2,75}
3b	>100	12,51 ^{+/-0,00}	6,25 ^{+/-0,00}	6,25 ^{+/-0,00}
3c	>100	6,45 ^{+/-2,40}	5,20 ^{+/-1,04}	4,16 ^{+/-1,04}
3d	>100	3,12 ^{+/-0,00}	0,64 ^{+/-0,14}	0,64 ^{+/-0,14}
3e	>100	2,97 ^{+/-1,18***}	2,61 ^{+/-0,53}	2,55 ^{+/-1,29***}
3f	>100	6,03 ^{+/-0,00}	2,61 ^{+/-0,52}	3,13 ^{+/-1,55}
3g	>100	8,34 ^{+/-2,08}	3,13 ^{+/-0,00}	4,16 ^{+/-1,05}
3h	>100	4,80 ^{+/-1,48***}	1,03 ^{+/-0,27}	1,94 ^{+/-0,39***}

Tab. 14: MIC Werte in μM der mono-NHC Komplexe 3a – 3h auf verschiedenen Bakterienstämmen

Als Positivkontrolle wurden die Antibiotika Amikacin (*P. aeruginosa*), Linezolid (*S. aureus*), und Ciprofloxacin (für alle anderen Stämme) eingesetzt. n=3; *n=1, **n=2, ***n=4; MIC = minimale inhibitorische Konzentration; MRSA = Methicillin-resistanter *Staphylococcus aureus*; ⊕ = grampositiv; ⊖ = gramnegativ.

Die Ergebnisse der Testung an verschiedenen Bakterienstämmen zeigten, dass alle mono-NHC Gold(I)komplexe der Struktur NHC-Au-Cl selektiv, aber im unterschiedlichen Ausmaß, die grampositiven Bakterienstämme *Enterococcus faecium* und *Staphylococcus aureus* hemmen. Die gramnegativen Bakterienstämme *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden kaum oder nur bei sehr hohen Konzentration gehemmt. Auch die Referenz Auranofin hemmte selektiv die grampositiven Stämme.

Gegen *Enterococcus faecium* stellten sich die Verbindungen **3e**, **3d** und **3h** als die aktivsten heraus (Abb. 13 und 14). Alle Goldkomplexe dieser Serie sind aktiver als das Referenzantibiotikum Ciprofloxacin und die Goldreferenz Auranofin. Bei dem Erreger *Staphylococcus aureus* konnte Komplex **3d** das Wachstum am effektivsten hemmen. Auch Komplex **3h** und Auranofin erzielten niedrige MIC Werte, welche für eine gute antiproliferative Wirksamkeit stehen. Diese drei Goldverbindungen waren aktiver als das

Antibiotikum Linezolid. Die Goldkomplexe mit einem Phenylimidazolliganden (**3a**, **3b**, **3c**) und mit einem halogenierten Benzimidazolliganden (**3f** und **3g**) waren den Derivaten mit den kleineren Imidazolliganden **3d** und **3e** und dem nicht halogenierten Benzimidazolligand **3h** in ihrer Aktivität überlegen. Auch bei der Hemmung der gramnegativen Bakterienstämme konnten die Verbindungen **3d** und **3e** den größten Effekt vorweisen, zeigten aber trotzdem niedrigere MIC Werte als die Antibiotika Ciprofloxacin und Amikacin.

Verbindung	<i>A. baumannii</i> ⊖	<i>E. coli</i> ⊖	<i>K. pneumoniae</i> ⊖	
Auranofin	40	50	>100	
Antibiotikum	0,2	0,02	0,07	
4a	>100	>100	>100	
4b	>100	>100	>100	
4c	38	60	>100	
4d	>100	>100	>100	
4e	>100	>100	>100	

Verbindung	<i>P. aeruginosa</i> ⊖	<i>E. faecium</i> ⊕	MRSA1 ⊕	MRSA2 ⊕
Auranofin	62	0,6	1,6	0,8
Antibiotikum	4,5	8,0	0,4	0,4
4a	52,0	11,6	6,3	6,7
4b	>100	40,0	100	66,0
4c	14	8,5	3,3	2,0
4d	>100	87,0	12,0	25,0
4e	>100	>100	100	100

Tab. 15: MIC Werte in µM der bis-NHC Komplexe **4a** – **4e** auf den verschiedenen Bakterienstämmen

Als Positivkontrolle wurden die Antibiotika Amikacin (*P. aeruginosa*), Linezolid (*S. aureus*), und Ciprofloxacin (für alle anderen Stämme) eingesetzt. n=1; MIC = minimale inhibitorische Konzentration; MRSA = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; ⊕ = grampositiv; ⊖ = gramnegativ.

In der Serie der bis-NHC Goldkomplexe wurden die Strukturen **4a** – **4e** auf den verschiedenen Bakterienstämmen getestet (Tab. 15). Der nicht halogenierte Phenylimidazol Gold(I)komplex **4c** zeigte als einzige Verbindung dieser Reihe eine wachstumshemmende Wirkung auf allen Stämmen. Am deutlichsten ist dies bei den grampositiven MRSA Stämmen

zu erkennen. Die Tendenz zu grampositiven Stämmen ist hier ebenfalls gegeben, eine klare Selektivität stellte sich jedoch nicht heraus. Der nicht halogenierte Imidazolkomplex **4e** ist bis 100 μM bei allen Stämmen inaktiv (Tab. 15).

5.2 Enzyminhibition der Thioredoxinreduktase von *Escherichia coli*

Getestet wurden die nicht metallhaltigen Synthesevor- und Zwischenstufen **1a** und **2a – 2h**, die neu synthetisierten mono-NHC Komplexe **3a – 3h** und bis-NHC-Komplexe **4a – 4h**, als auch die Referenzsubstanzen **R1 – R4**. Bei der Bestimmung der Enzyminhibition wurden für jede Serie exemplarisch auch der Einfluss der unterschiedlichen Lösemittel DMF, DMSO und Wasser als Stammlösungen untersucht.

5.2.1 Phenylimidazol und (Benz)Imidazoliumiodide

Die Testung an der Thioredoxinreduktase von *E.coli* (TrxR *E.coli*) zeigt, dass die neutrale 4'-Phenylimidazol **1a** keine enzymhemmende Aktivität bis 200 μM mit verschiedenen Stammlösungen aus den aufgeführten Lösemitteln DMF und DMSO aufweist. In Wasser war die Substanz nicht löslich. Bei den (Benz)Imidazoliumiodidliganden **2b – 2h** konnte in DMF ebenfalls keine inhibitorische Aktivität bis 100 μM festgestellt werden. Der fluoriierte Phenylimidazoliumiodidligand **2a** zeigte sogar in keinem der drei Lösemittel bis 200 μM einen inhibitorischen Effekt auf die TrxR. Alle nicht goldhaltigen Vorstufen waren folglich inaktiv (Tab. 16).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	TrxR <i>E.coli</i> IC ₅₀ [μM]
Imidazol	1a	DMF	> 200
Imidazol	1a	DMSO	> 200
Imidazol	1a	H ₂ O	n.l.
Ligand (Imidazoliumiodid)	2a	DMF	> 200
Ligand (Imidazoliumiodid)	2a	DMSO	> 200
Ligand (Imidazoliumiodid)	2a	H ₂ O	> 200
Liganden (Imidazoliumiodide)	2b – 2g	DMF	> 100

Tab. 16: IC₅₀ Werte des Enzyminhibitionstests in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lösemitteln (n = 3); n.l. = nicht löslich bis 525 μM

5.2.2 Mono-NHC Gold(I)komplexe

Für die mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** – **3h** wurden IC₅₀ Werte im nanomolaren Bereich von 108 – 446 nM erzielt (Tab. 17).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	TrxR E.coli IC ₅₀ [µM]
FPhIm-Au-Cl	3a	DMF	0,228 ^{+/-0,051}
FPhIm-Au-Cl	3a	DMSO	0,367 ^{+/-0,042}
FPhIm-Au-Cl	3a	H ₂ O	n.l.
BrPhIm-Au-Cl	3b	DMF	0,446 ^{+/-0,029}
HPhIm-Au-Cl	3c	DMF	0,134 ^{+/-0,031}
BrIm-Au-Cl	3d	DMF	0,309 ^{+/-0,013}
HIm-Au-Cl	3e	DMF	0,108 ^{+/-0,028}
FBeIm-Au-Cl	3f	DMF	0,408 ^{+/-0,040}
BrBeIm-Au-Cl	3g	DMF	0,442 ^{+/-0,017}
HBeIm-Au-Cl	3h	DMF	0,134 ^{+/-0,029}

Tab. 17: IC₅₀ Werte des Enzyminhibitionstests in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lösemitteln (n = 3); n.l. = nicht löslich bis 525 µM

Die nicht halogenierten Verbindungen **3e**, **3c** und **3h** zeigten geringfügig höhere Aktivitäten zwischen 108 – 134 nM. Die halogenierten Pendants sind dagegen immer 2- bis 3-fach weniger aktiv mit IC₅₀ Werten zwischen 228 – 446 nM (Tab. 17). Bei dem fluorierten Phenylimidazolkomplex **3a** sank die Aktivität um das 1,6-Fache ab, wenn der Versuch in DMSO durchgeführt wurde. Eine Halogenierung führte bei jeder Substanz zu einer verminderten inhibitorischen Wirkung auf die Thioredoxinreduktase. Die Änderung der Grundkörpergröße brachte nur eine vernachlässigbare Aktivitätssteigerung. Der Komplex mit dem kleinsten Imidazolgrundkörper **3e** war dem Komplex mit dem größeren Benzimidazolgrundkörper **3h** und Phenylgrundkörper **3c** in seiner inhibitorischen Potenz überlegen (Abb. 66).

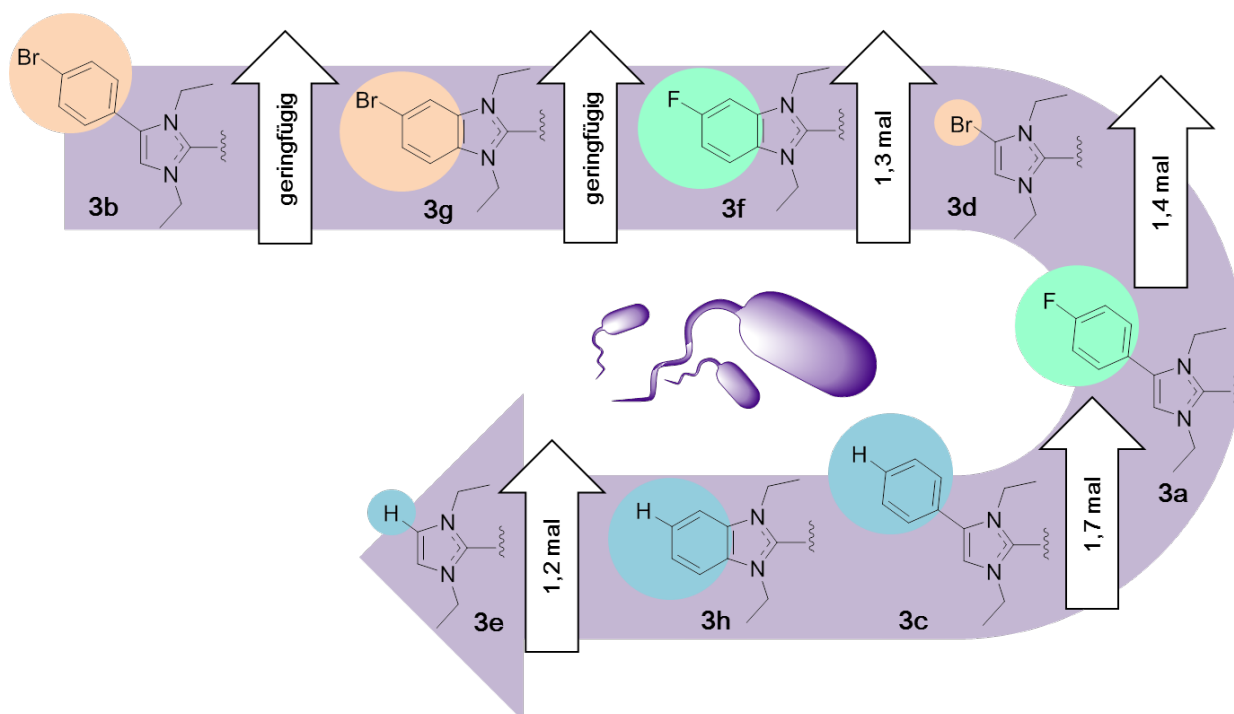


Abb. 65: Aktivitätssteigerungen der Serie mit der Grundstruktur NHC-Au-Cl entsprechend der Komplexe 3a – 3h abhängig von der Substitution des (Benz)imidazolrings an der bakteriellen TrxR (es wurde hier jeweils nur der NHC-Teil der Komplexe dargestellt)

5.2.3 Bis-NHC Gold(I)komplexe

Die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** – **4e** waren bei der bakteriellen TrxR um das 185- bis 3085-Fache schwächer wirksam als die jeweiligen mono-NHC Gold(I)komplexe. Die IC_{50} Werte lagen hier zwischen 29,95 – 410,94 μ M (Tab. 18). Die kleinste Aktivitätsdifferenz in Bezug auf die mono-NHC Gold(I)komplexe zeigt hierbei der nicht halogenierte Imidazolkomplex **4d**, die größte Differenz war bei der bromierten Imidazolstruktur **4e** zu finden.

Für Komplex **4a** wurde auch der Einfluss der Lösemittel DMF und DMSO untersucht. Die Experimente zeigen, dass die IC_{50} Werte in DMF 2,35-fach niedriger sind als in DMSO.

In dieser Serie der bis-NHC Gold(I)komplexe sind insgesamt betrachtet die großen Differenzen in den Aktivitäten zwischen den Verbindungen auffällig.

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	TrxR E.coli IC ₅₀ [μM]
FPhIm-Au ⁺ -FPhIm I ⁻	4a	DMF	48,69 ^{+/-5,00}
FPhIm-Au ⁺ -FPhIm I ⁻	4a	DMSO	114,43 ^{+/-15,18}
FPhIm-Au ⁺ -FPhIm I ⁻	4a	H ₂ O	n.l.
BrPhIm-Au ⁺ -BrPhIm I ⁻ *	4b	DMF	96,61 ^{+/-13,38}
HPhIm-Au ⁺ -HPhIm I ⁻	4c	DMF	29,95 ^{+/-7,07}
BrIm-Au ⁺ -BrIm I ⁻	4d	DMF	57,20 ^{+/-6,20}
HIm-Au ⁺ -HIm I ⁻	4e	DMF	410,94 ^{+/-42,13}

Tab. 18: IC₅₀ Werte des Enzyminhibitionstests in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lösemitteln (n = 3); n.l. = nicht löslich bis 525 μM; *Lösung wird bei der Verdünnung von DMSO mit PBS Puffer leicht milchig, ohne jedoch (auch nach längerem Stehenlassen) einen sichtbaren Niederschlag zu bilden

Strukturwirkungsbeziehungen lassen sich bei diesen Derivaten nicht feststellen. Weder in der Betrachtung der Substitution, noch in der Grundkörpergröße lässt sich ein Muster erkennen (Abb. 67).

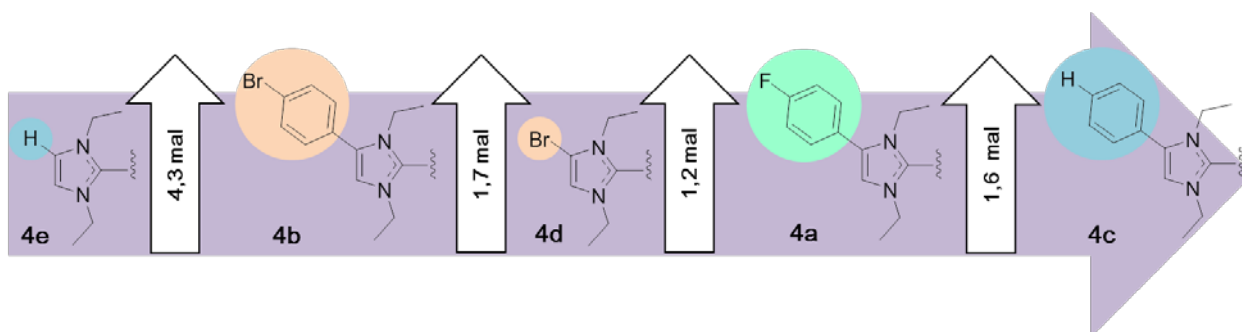


Abb. 66: Aktivitätssteigerungen der Serie mit der Grundstruktur [NHC-Au-NHC]⁺ I⁻ entsprechend der Komplexe 4a – 4e abhängig von der Substitution des Imidazolrings an der TrxR von E.coli (es wurde hier nur der NHC-Teil der Komplexe dargestellt)

5.2.4 Goldhaltige Referenzen

Die Goldkomplexreferenzen Auranofin **R1** und Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2** konnten die bakterielle TrxR im selben Maße hemmen wie die mono-NHC Komplexe. Es wurden in

DMF IC₅₀ Werte im mittleren nanomolaren Bereich zwischen 272 nM (**R2**) und 296 nM (**R1**) ermittelt. Die inhibitorische Aktivität konnte für die Referenz **R2** durch das Lösen in DMSO um das 1,5-Fache erhöht werden, während für **R1** die Aktivität um das 1,9-Fache sank. In Wasser zeigten beide Komplexe keine ausreichende Löslichkeit (Tab. 19).

Verbindung	Abkürzung	Lösemittel	TrxR E.coli IC ₅₀ [µM]
Auranofin	R1	DMF	0,296 ^{+/-0,069}
Auranofin	R1	DMSO	0,556 ^{+/-0,064}
Auranofin	R1	H ₂ O	n.l.
Et ₃ PAu-Cl	R2	DMF	0,272 ^{+/-0,013}
Et ₃ PAu-Cl	R2	DMSO	0,182 ^{+/-0,052}
Et ₃ PAu-Cl	R2	H ₂ O	n.l.
AuCl*	R3	DMF	0,955 ^{+/-0,149}
AuCl	R3	DMSO	0,205 ^{+/-0,013}
AuCl (sofort) *	R3	H ₂ O	0,188 ^{+/-0,017}
AuCl (nach 60 min) **	R3	H ₂ O	0,647 ^{+/-0,011}
AuCl ₃	R4	DMF	0,169 ^{+/-0,046}
AuCl ₃	R4	DMSO	0,167 ^{+/-0,010}
AuCl ₃	R4	H ₂ O	0,240 ^{+/-0,004}

Tab. 19: IC₅₀ Werte des Enzyminhibitionstests in Abhängigkeit von unterschiedlichen Lösemitteln (n = 3); n.l. = nicht löslich bis 525 µM; *Präzipitation als schwarzer Niederschlag nach längerem Stehenlassen der Probe sichtbar, als Lösung aufgetragen; **Präzipitation als schwarzer Niederschlag nach längerem Stehenlassen der Probe sichtbar, als Suspension aufgetragen

Ähnliche Aktivitäten konnte für das Gold(III)chlorid **R4** erzielt werden. Die Verwendung der Lösemittel DMF und DMSO als Stammlösungen zeigten keinen Aktivitätsunterschied, die IC₅₀ Werte lagen bei ca. 168 nM. Wurde das Salz in Wasser gelöst, erhöhten sich die Werte um das 1,4-Fache auf 240 nM.

Bei der goldhaltigen Referenz **R3**, dem Gold(I)chlorid, wurde die Aktivität stark durch die Löslichkeit beeinflusst. Am besten und stabilsten konnte **R3** in DMSO gelöst werden. Der

IC₅₀ Wert zeigt eine vergleichbare Hemmung zu den anderen Referenzen bei 205 nM. In DMF dagegen lag die halbmaximale inhibitorische Konzentration bei 955 nM. In Wasser kam es drauf an, wie schnell die gelöste Probe verwendet wurde. Bei sofortiger Zugabe zum Enzym konnte mit einem IC₅₀ Wert von 188 nM die stärkste Enzymhemmung beobachtet werden. Wurde der Versuch allerdings erst nach einer Stunde durchgeführt, sank der IC₅₀ Wert auf 647 nM ab. In DMF, als auch in Wasser, trat nach einiger Zeit ein schwarzes Präzipitat auf, welches nicht resuspendierbar war. Dieses ist höchst wahrscheinlich auf eine Disproportionierungsreaktion zurückzuführen, bei der neben dem elementaren Gold(0) auch Gold(III) entsteht und zu einer Reduzierung der tatsächlichen Goldkonzentration in der Lösung führt [138]. Somit wäre die schlechtere Hemmung des Enzyms auf Löslichkeits- und Instabilitätsprobleme zurückzuführen.

6 Diskussion

In dieser Arbeit wurden die aktivsten NHC-Gold(I)komplexe von Rubbiani et al. [144, 274] als Leitstrukturen modifiziert und weiterentwickelt (Abb. 68). Neben der Änderung des Ligandengrundkörpers wurden weiterhin analytisch verfolgbare Substituenten eingefügt, um Strukturwirkungsbeziehungen zu untersuchen und neue Aspekte bezüglich der Bioverteilung und Stabilität dieser Komplexe aufzudecken.

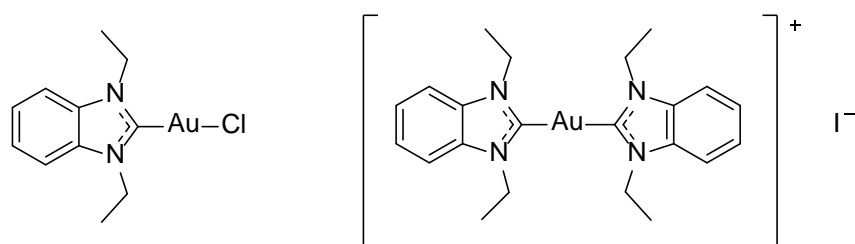


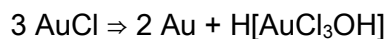
Abb. 67: Leitstrukturen der mono-NHC Gold(I)komplexe (links) und bis-NHC Gold(I)komplexe (rechts) von Rubbiani et al. [144, 274]

6.1 Neue NHC-Gold(I)komplexe als potenzielle Zytostatika

Die Ergebnisse des Zytotoxizitätstest mit drei verschiedenen Tumorzelllinien und einer gesunden Nierenzelllinie haben gezeigt, dass keine der getesteten Verbindungen selektiv wirkt.

Die freien Liganden der Komplexe **2a** – **2h** besitzen keine antiproliferativen Eigenschaften, auch wenn exemplarisch für **2a** nachgewiesen konnte, dass dieser in die Zellen aufgenommen wird. Die zelluläre Konzentration lag durchschnittlich höher als bei den Goldsalzen **R3** und **R4**, aber niedriger als bei allen anderen getesteten Goldkomplexen (**3a** – **3h**, **4a** – **4e**, **R1** und **R2**). Für die Goldchloride **R3** und **R4** wurde keine oder nur eine vernachlässigbar geringe Aktivität festgestellt. Das Gold(III)chlorid **R4** ist aufgrund seiner besseren Löslichkeit in wässrigen Medien etwas aktiver als das schlecht lösliche

Gold(I)chlorid **R3**. Gold(I)chlorid **R3** unterliegt zudem im wässrigen Medium einer Disproportionierungsreaktion zu elementarem Gold und Trichlorogold(III)säure [138]:



Das elementare Gold fällt aus und kann nicht mehr in die Zellen aufgenommen werden oder mit Zielstrukturen interagieren. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität.

Die mono-NHC Gold(I)komplexe **3a – 3h** zeigten IC_{50} Werte zwischen 4 – 17 μM , für die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a – 4e** wurden Werte zwischen 0,05 – 6 μM festgestellt (Kapitel 4.1).

Die höhere Aktivität der bis-NHC Gold(I)komplexe, im Vergleich zu den entsprechenden mono-NHC Gold(I)komplexen, korreliert mit strukturverwandten Verbindungen aus der Literatur. [144, 274, 303] Die Referenzkomplexe Auranofin **R1** und Chlorido(triethylphosphan)gold(I) **R2** konnten bezüglich ihrer Aktivität zwischen den mono- und bis-NHC Gold(I)komplexen eingeordnet werden.

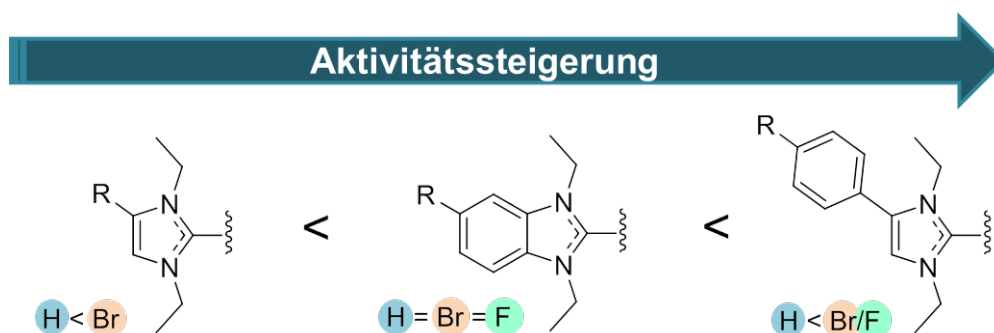
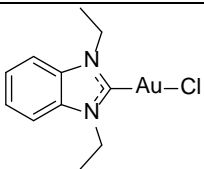
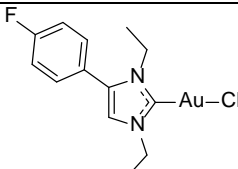
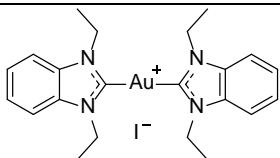
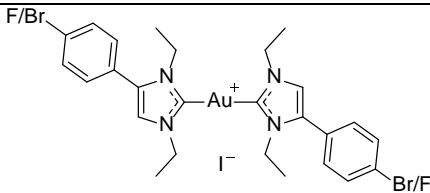


Abb. 68: Aktivitätssteigerungen im Zytotoxizitätsassay in Abhängigkeit der NHC-Liganden und der Halogensubstituenten der Komplexe, R = Br/F/H

Aus diesen Ergebnissen konnten erste Strukturwirkungsbeziehungen abgeleitet werden. Die Aktivität der mono-, als auch der bis-NHC Gold(I)komplexe war vor allem von der Größe des Grundkörpers abhängig (Abb. 69). Ausgehend von der Benzimidazol-Leitstruktur, wurde bei beiden Komplexserien die Aktivität herabgesetzt, wenn der Ligand verkleinert wurde und

erhöht wenn der Ligand vergrößert wurde. Die halogenierten Verbindungen waren bei den Imidazol- und Phenylimidazolkomplexen die jeweils aktiveren. Zwischen den drei Benzimidazolkomplexen der mono-NHC Komplexe konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Im Vergleich zu den Leitstrukturen konnte durch Änderung der Ligandengröße und der Einführung von Halogenen die durchschnittliche antiproliferative Wirkung auf die Tumorzelllinien erhöht werden (Tab. 20). Die aktivsten Verbindungen stellten jeweils die fluorierten Phenylimidazol-Komplexe dar. Bei den bis-NHC Gold(I)komplexen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen dem bromierten und dem fluorierten Phenylimidazolkomplex festgestellt werden.

Leitstrukturen	IC ₅₀ Werte	Aktivster neuer Komplexe	IC ₅₀ Werte
	4,57 – 13,30 µM		4,62 – 6,14 µM
	0,44 – 0,81 µM		0,05 – 0,18 µM

Tab. 20: Darstellung der aktivsten neuen Verbindungen im Vergleich zu den Leitstrukturen im Zytotoxizitätsassay

Des Weiteren konnte zwischen den Zellaufnahmestudien in MCF-7 Zellen und den Proteinbindungsstudien mit Serumalbumin, als auch dem fetalem Kälberserum eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Proteinbindung, der Zellaufnahme und den antiproliferativen Effekten für die neuen Goldkomplexe festgestellt werden (Abb. 70). Die mono-NHC Gold(I)komplexe zeigten eine sehr hohe Proteinbindung an FCS Proteine (80 – 100 %), dazu eine geringe Zellaufnahme und mittlere IC₅₀ Werte von 4 – 17 µM im Zytotoxizitätstest. Die bis-NHC Gold(I)komplexe hingegen konnten durch ihre geringe Proteinbindung an FCS Proteine (4 – 58 %) stärker in die Zellen aufgenommen werden. Dies

fürte zu sehr niedrigen IC_{50} Werten (0,05 – 6 μM) bei der verwendeten Zelllinie MCF-7. Die Referenzen Auranofin **R1** und Gold(I)chlorid **R3** zeigten eine moderate Proteinbindung (73 – 97 %). Bei dem Goldkomplex Auranofin korreliert dies mit den niedrigeren IC_{50} Werten (1,44 – 3,79 μM) im Vergleich zu den mono-NHC Gold(I)komplexen (4,46 – 16,97 μM) im Zytotoxizitätsassay.

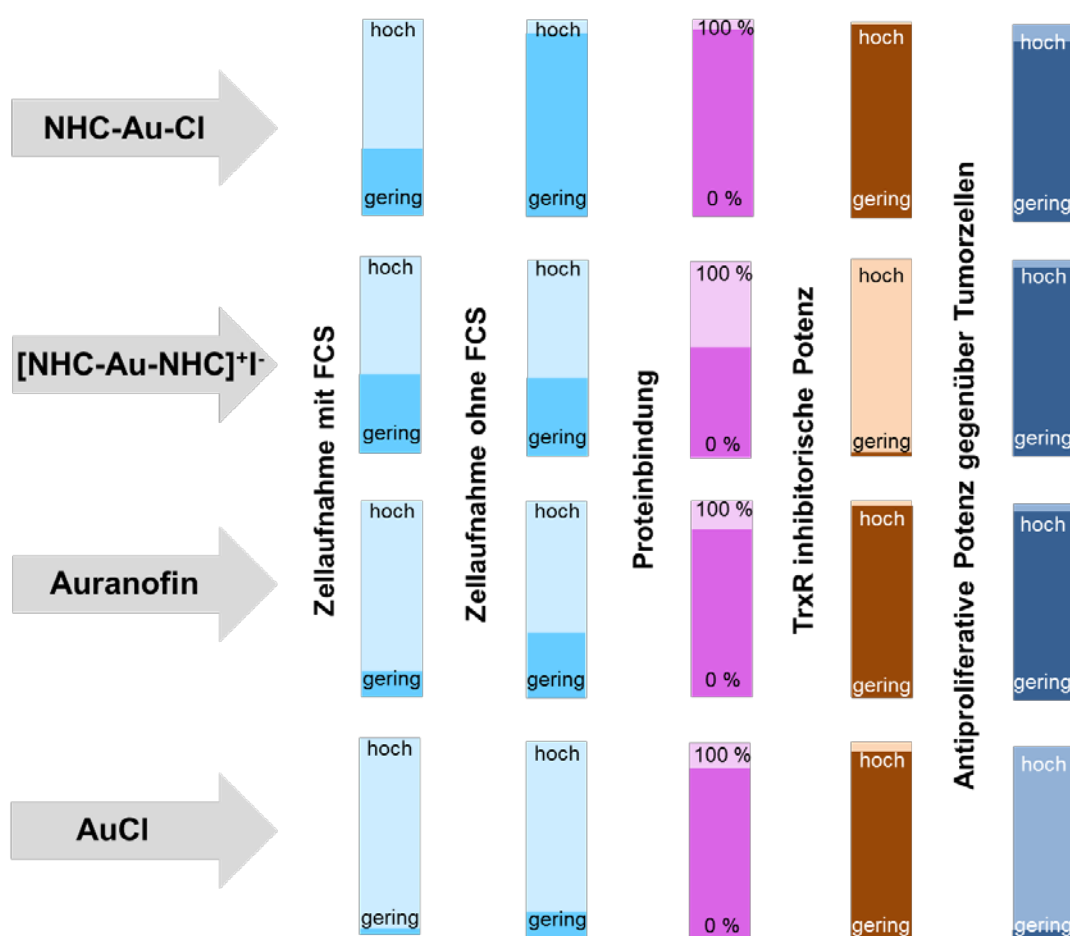


Abb. 69: Zusammenfassung der Ergebnisse für Gold(I)-Verbindungen als Zytostatika, die Bezugswerte für die verschiedenen Test sind für die Zellaufnahme sind 15 nmol Gold/mg Zellprotein, bei der TrxR Hemmung ein IC_{50} von 50 μM und beim Zytotoxizitätstest 300 μM

Zudem wird deutlich, dass die Liganden für die Zellaufnahme von Bedeutung sind. Das Gold(I)chlorid weist eine ähnlich hohe Proteinbindung an Serumproteine wie das Auranofin auf. Die antiproliferativen Effekte sind hingegen nur in sehr hohen Konzentrationen

festzustellen (206,15 – über 300 μM), was wiederum mit der geringen Zellaufnahme korreliert. Alleine die Bindung an die Proteine kann hierbei also nicht der Grund für die geringere Aufnahme sein. Aus den Daten kann abgeleitet werden, dass das Gold in seiner rein ionischen Form, als auch die Liganden alleine, weniger stark in die Zellen aufgenommen werden als die Goldkomplexe beider Serien. Es kann also von einem synergistischen Effekt des Liganden und dem Metall ausgegangen werden, der dafür verantwortlich ist, dass die Komplexe vermehrt in die Zellen gelangen können.

Lipophilere Verbindungen sind leichter membrangängig als hydrophile Verbindungen. Die Bestimmung der log P Werte bestätigt, dass die mono-NHC Gold(I)komplexe lipophiler als die bis-NHC Gold(I)komplexe sind und Auranofin in der Reihe die hydrophilste Struktur darstellt (Kapitel 4.2.4). Wie zu erwarten, erhöhen die Halogene, im Vergleich zu den Wasserstoffsubstituenten, bei den exemplarisch untersuchten Verbindungen die Lipophilie. In Verbindung mit den Zellaufnahmestudien ohne Serumproteine werden die lipophileren Verbindungen stärker in die Zellen aufgenommen als die hydrophilen. Die Serumproteine binden bei den untersuchten Verbindungen allerdings sehr stark an die lipophilen mono-NHC Gold(I)komplexe und etwas weniger stark an das Auranofin. Dadurch wird die Zellaufnahme in unterschiedlichem Maße herabgesetzt. Die Korrelation zwischen der Lipophile und der Zellaufnahme spricht für einen vorwiegend passiven Transport in die Zellen. [304, 305]

Zu einer etablierten Zielstruktur von Goldkomplexen gehört die Thioredoxinreduktase der Säugetiere. Bei den mono-NHC Gold(I)komplexen weisen die halogenierten Komplexe tendenziell eine höhere Aktivität (0,04 – 0,17 μM) im Vergleich zu den nicht halogenierten Pendants (0,21 – 0,36 μM) auf. Die verschiedenen Grundkörper zeigen einen eher vernachlässigbaren Effekt (Abb. 71).

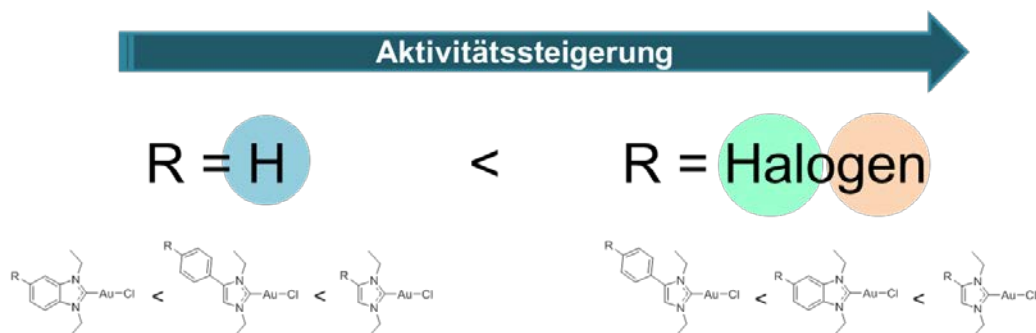


Abb. 70: Strukturwirkungsbeziehungen der mono-NHC Gold(I)komplexe bei der Säugetier-TrxR, die Einführung der Halogene hat einen sehr großen Einfluss auf die Aktivitätssteigerung im Vergleich zu der sehr geringen Änderung der Aktivität bei dem Austausch des Ligandengrundkörpers.

Die bis-NHC Gold(I)komplexe zeigen teils sehr hohe IC_{50} Werte und damit eine eher schlechte Hemmung des Enzyms im oberen mikromolaren Bereich. Auch bei diesen Verbindungen sind die halogenierten Komplexe (0,72 – 30,29 μM) aktiver als die unhalogenierten Derivate (71,92 – 127,78 μM). Bei dieser Serie konnte die Aktivität zusätzlich durch die Vergrößerung des Ligandengrundkörpers beeinflusst werden (Abb. 72).

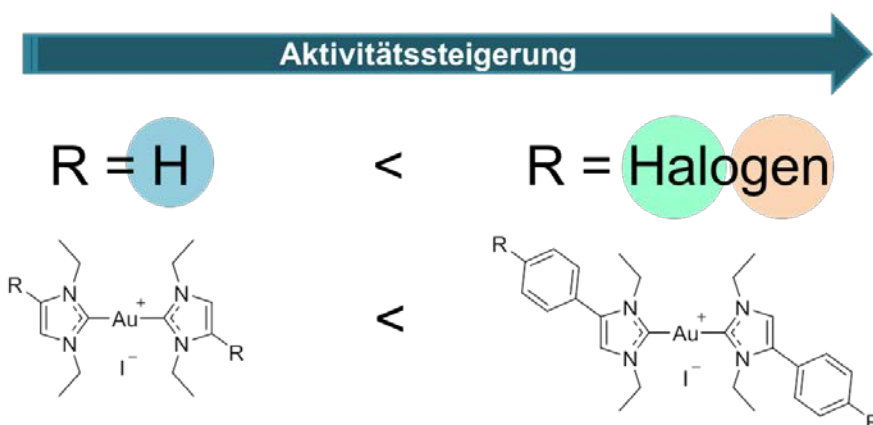
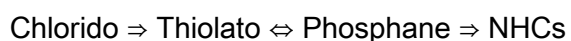


Abb. 71: Strukturwirkungsbeziehungen der bis-NHC Gold(I)komplexe bei der Säugetier-TrxR, die Einführung der Halogene hat einen ebenso großen Einfluss auf die Aktivitätssteigerung wie die Vergrößerung des Ligandengrundkörpers.

Die inhibitorischen Effekte auf das isolierte Enzym, im Vergleich zu den antiproliferativen Aktivitäten in der Zellkultur, können keine direkte Korrelation erkennen lassen. Die

Aktivitätsunterschiede zwischen den mono- und bis-NHC Komplexen können dadurch erklärt werden, dass die mono-NHC Komplexe aufgrund ihrer sehr hohen Proteinbindung zu einem viel geringeren Anteil in die Zellen aufgenommen werden und somit nur geringere intrazellulären Konzentrationen bereit stehen, um an der Thioredoxinreduktase wirken zu können. Am isolierten Enzym spielen diese Faktoren keine Rolle. Wichtig ist dabei nur die Stabilität der Liganden. Die Hemmung des Enzyms beruht auf der kovalenten Bindung des Golds an das Selenocystein des aktiven Zentrums des flexiblen Arms am C-Terminus des Enzyms (Kapitel 1.6.1). Diese Bindung kann leichter eingegangen werden, wenn der Komplex eine gute Abgangsgruppe besitzt, wie es bei den mono-NHC Komplexen der Fall ist. Die Berechnungen von Energiebindungsenergien der Leitstrukturen belegen, dass der Chlorido-Ligand im Vergleich zum NHC-Liganden eine bessere Abgangsgruppe darstellt. [144] Sadler und Sue [135] haben ebenfalls die thermodynamische Stabilität von verschiedenen Liganden zum Gold(I) berechnet, insgesamt ergibt sich daraus folgende Stabilitätsreihenfolge:



Die Stabilität der verschiedenen Bindungen spiegelt sich in den Ergebnissen des Enzyminhibitionstests wieder. Komplexe mit einem Chlorido-Liganden können leichter an die Zielstruktur binden und erreichen somit auch niedrigere IC_{50} Werte. Die große Varianz in den Aktivitäten bei den mono-NHC Komplexen kann durch unterschiedlich starke Stabilisierungen der verschiedenen NHC-Liganden erklärt werden (Abb. 73). Innerhalb der gleichen Strukturen (Et_3P -Au-Cl vs. Auranofin und mono-Komplexe vs. bis-Komplexe) korreliert die Stabilität der Liganden mit ihrer Aktivität.

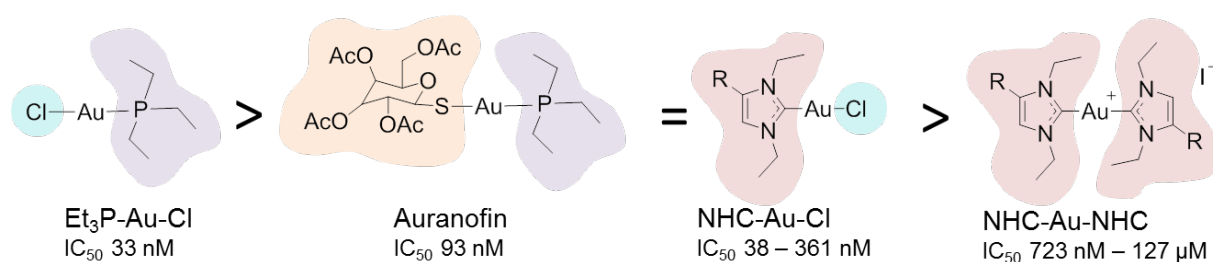


Abb. 72: Aktivitätsunterschiede im Enzyminhibitionstest der Säugetier-TrxR

Als hauptsächlicher Wirkmechanismus für kationische lipophile Komplexe (wie den bis-NHC Gold(I)komplexen) wird die Akkumulation in den Mitochondrien und den daraus resultierenden Auslösung der Caspasekaskade postuliert, welcher letztendlich in die Apoptose führt (Kapitel 1.5). Den beiden unterschiedlichen Komplexstrukturen greifen also unterschiedliche Zielstrukturen bevorzugt an, dies erklärt die unterschiedlichen Aktivitäten in dem Zytotoxizitätstest und dem Enzyminhibitionstest.

Leitstrukturen	IC_{50} Werte	Aktivster neuer Komplexe	IC_{50} Werte
	0,36 µM		0,04 µM
	4,89 µM		0,72 µM

Tab. 21: Darstellung der aktivsten neuen Verbindungen im Vergleich zu den Leitstrukturen im Enzyminhibitionsassay

Durch die Modifikationen der Liganden konnten im Vergleich zu den Leitstrukturen potentere Inhibitoren der TrxR gefunden werden. In der Serie der mono-NHC Gold(I)komplexe konnte durch die Halogenierung und der Ligandenverkleinerung eine potenterer Inhibitor gefunden werden. Bei den bis-NHC Gold(I)komplexen stieg die Aktivität mit der Vergrößerung des Liganden und einer gleichzeitigen Einführung eines Fluorsubstituenten (Tab. 21). In beiden

Fällen konnte die Aktivität durch eine Halogenierung gesteigert werden, eine zusätzliche Ausbildung von Halogenbindungen zur Zielstruktur könnte einen Grund dafür darstellen (Kapitel 1.7.1).

6.2 Neue NHC-Gold(I)komplexe als potenzielle Antibiotika

Im Mikroboullion-Verdünnungstest wurden die mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** – **3h**, die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** – **4e** und die Referenz Auranofin **R1** mit verschiedenen Bakterienstämmen inkubiert und die minimale Hemmkonzentration bestimmt.

Alle Goldkomplexe, die eine Aktivität gezeigt haben, wiesen eine Selektivität gegenüber den grampositiven Bakterienstämmen auf. Die mono-NHC Gold(I)komplexe **3a** – **3h** konnten die Wirkung des Antibiotikums Ciprofloxacin und des Auranofins bei dem grampositiven Stamm *Enterococcus faecium* übertreffen. Bei den beiden MRSA Stämmen konnten einstellige MIC Werte für alle mono-NHC Gold(I)komplexe festgestellt werden, wobei die Komplexe **3d** und **3h** das Bakterienwachstum stärker hemmten als das Antibiotikum Linezolid und die Referenz Auranofin **R1** (Abb. 74).

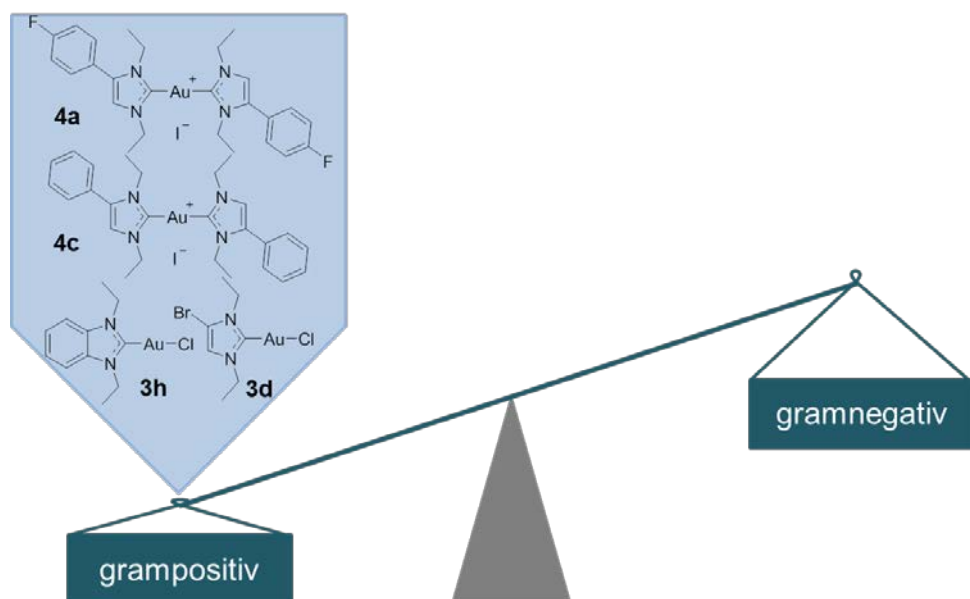


Abb. 73: Selektivität der Gold(I)komplexe gegenüber grampositiven Bakterienstämmen im Mikroboullion-Verdünnungstest

Es konnten keine konkreten Strukturwirkungsbeziehungen abgeleitet werden. Die Verbindungen mit den sterisch voluminösen Phenylimidazolliganden zeigten im Vergleich allerdings geringere Aktivitäten. Auch die bis-NHC Gold(I)komplexe hemmen tendenziell die grampositiven Erreger stärker als die gramnegativen. Die Antibiotika als auch das Auranofin und die mono-NHC Gold(I)komplexe sind jedoch immer stärker wirksam. Nur für die bis-NHC Gold(I)komplexe **4a** und **4c** konnten MIC Werte im einstelligen mikromolaren Bereich bei den grampositiven Bakterienstämmen festgestellt werden.

Im Enzyminhibitionstest mit der isolierten bakteriellen TrxR erzielen bei den mono-NHC Gold(I)komplexen die nicht halogenierten Komplexe höhere Aktivitäten im Vergleich zu den halogenierten. Die Goldkomplexe mit Fluor sind immer etwas aktiver als die bromierten Pendants. Tendenziell sind die Komplexe mit dem kleinsten Imidazolgrundkörper aktiver als die mit einem Phenylimidazolgrundkörper oder Benzimidazolgrundkörper. Im Bezug zum Mikroboullion-Verdünnungstest kann keine offensichtliche Korrelation festgestellt werden (Abb. 75).

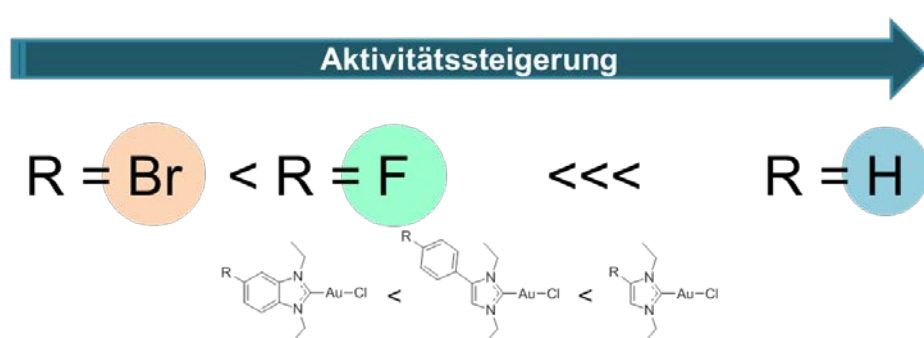


Abb. 74: Aktivitätssteigerungen der mono-NHC Gold(I)komplexe im Enzyminhibitionsassay an der *E.coli*/TrxR

Bei den bis-NHC Komplexen korreliert die Hemmung der bakteriellen Thioredoxinreduktase mit den MIC Werten des Bakterienwachstumstests (Abb. 76). Ein direkter Zusammenhang

zwischen der Hemmung der Thioredoxinreduktase und der antibakteriellen Wirkung scheint hier plausibel. Strukturell können jedoch keine direkten Rückschlüsse gezogen werden.

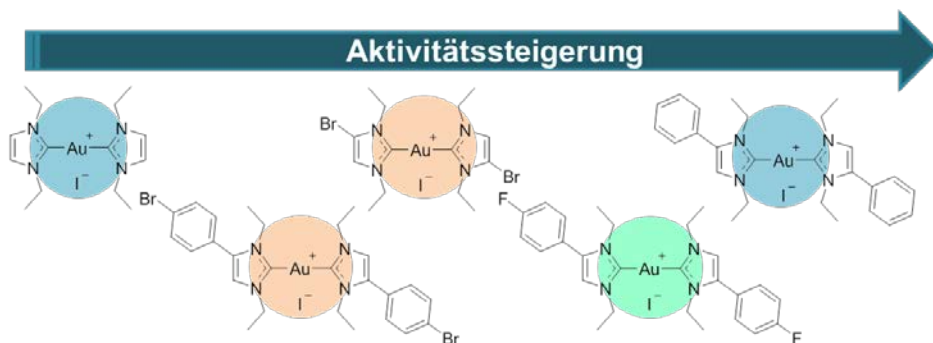


Abb. 75: Aktivitätssteigerungen der bis-NHC Gold(I)komplexe im Enzyminhibitionsassay an der *E.coli*/TrxR

Die Ergebnisse des Enzyminhibitionstests geben ein Hinweis dahingehend, dass in den Bakterien, genau wie in den Säugetieren, die Thioredoxinreduktase ein Target für die NHC-Gold(I)komplexe darstellt und zeigt erstmals einen neuen möglichen Wirkmechanismus dieser Verbindungen in der antibakteriellen Therapie auf. Die Selektivität gegenüber grampositiven Stämmen kann darauf zurückgeführt werden, dass für viele grampositive Erreger kein Glutathionsystem bestätigt werden konnte. Das Fehlen des antioxidativen Enzymsystems macht diese Mikroorganismen anfälliger für die Hemmung der Thioredoxinreduktase, da sie kein Ersatzsystem besitzen, um die Redoxbalance in den Zellen weiterhin aufrecht zu erhalten, was unweigerlich zum Zelltod führt (Kapitel 1.6.2). Ein weiterer Grund für die bevorzugte Hemmung der grampositiven Bakterien kann ebenfalls im Aufbau der Zellmembran liegen. Während gramnegative Bakterien eine äußere und eine innere Zellmembran besitzen, weisen die grampositiven nur eine einzige Cytoplasmamembran auf. Die äußere Membran ist polarer als die innere und besitzt zudem Effluxpumpen. Damit bildet sie eine selektive Permeationsbarriere für lipophile Verbindungen, wie den NHC Gold(I)komplexen dieser Arbeit. [306, 307]

Halogenbindungen scheinen bei der bakteriellen TrxR keine Rolle zu spielen. Auch hier sind die mono-NHC Gold(I)komplexe aufgrund ihrer guten Abgangsgruppe den bis-NHC Gold(I)komplexen überlegen. Im Gegensatz zu den humanen Tumorzellen sind bei den Bakterien die mono-NHC Gold(I)komplexe im Wachstumshemmtest, als auch im Enzyminhibitionstest, effektiver als die bis-NHC Gold(I)komplexe. Dies kann darauf zurückgeführt werden, dass Bakterien keine Mitochondrien besitzen und dadurch der hauptsächliche Wirkmechanismus der bis-NHC Gold(I)komplexe in diesem Zusammenhang entfällt.

Die größere Potenz der getesteten Goldkomplexe bei der Säugetier-TrxR kann dadurch erklärt werden, dass dieses aktive Zentrum räumlich viel einfacher zugänglich ist, wodurch es für größere Strukturen sehr einfach zu erreichen ist. Die breite Substratspezifität erklärt sich zudem durch die größere Affinität des Golds zum Selenocystein im aktiven Zentrum der Säugetier-TrxR im Vergleich zum Cystein der bakteriellen TrxR (siehe Kapitel 1.6.1 und 1.6.2).

6.3 Stabilität

Die Untersuchung der Stabilität erfolgte über photometrische Messungen der mono-NHC Gold(I)komplexe (Kapitel 4.2.5) und HPLC-MS Studien für die bis-NHC Gold(I)komplexe (Kapitel 4.2.6). Weitere Experimente wurden durch die gleichzeitige Bestimmung des Fluor- und Goldgehalts mit der HR-CS MAS Technik (Kapitel 4.2.3) ergänzt.

Die photometrischen Stabilitätsuntersuchungen der mono-NHC Gold(I)komplexe mit den Phenylimidazolliganden **3a** – **3c** zeigen eine eindeutige Änderung des Absorptionsspektrums innerhalb der ersten Stunde. Der Vergleich mit den Referenzstrukturen der entsprechenden freien Liganden und bis-Komplexe lässt darauf schließen, dass sich eher der entsprechende

bis-Komplex zu bilden scheint, als dass nur die entsprechenden Liganden freigesetzt werden. Die Ausbildung einer Schulter ist nur bei den bis-Komplexen, nicht aber bei den Liganden zu beobachten.

Diese Beobachtungen korrelieren mit dem Konzentrationsverhältnis von Fluor zu Gold in den MAS Messungen. Es ist denkbar, dass sich die mono-Komplexe zu den bis-Komplexen umlagern und somit ebenfalls in die Zellen aufgenommen werden können (Abb. 77). Um diesen Sachverhalt im Detail zu entschlüsseln sind weiterführende Untersuchungen notwendig.

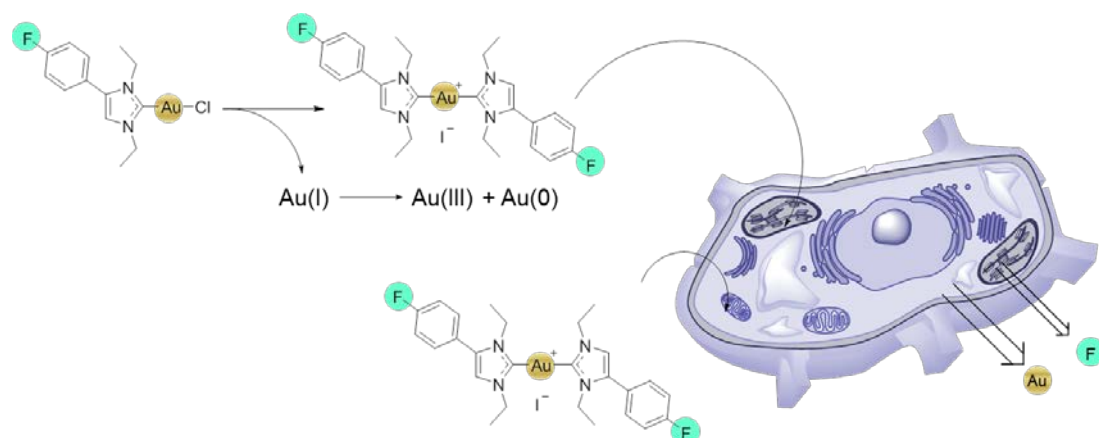


Abb. 76: Mögliche Aufnahmemechanismen der Goldkomplexe 3a und 4a

Die LC-MS Untersuchungen des bis-NHC Gold(I)komplexes **4a** bestätigen die Stabilität dieser Verbindung in DMF, DMSO, Wasser, PBS Puffer und Zellkulturmedium bis zu vier Tagen. In n-Octanol dissoziiert der Komplex, wobei der entsprechende Ligand freigesetzt wird und nach 4 Tagen noch 88 % der nicht dissoziierten Verbindung vorliegen. Die dazu sehr geringe Proteinbindung (10 – 21 %) unterstützt die Annahme, dass der Komplex auch in Gegenwart der Zellen extrazellulär stabil bleibt und komplett in die Zellen aufgenommen werden kann.

Die MAS Studien zeigten weiterhin, dass nach einer Stunde für den mono-NHC Gold(I)komplex **3a** bereits die doppelte Menge an Fluor im Vergleich zu Gold in den Zellen gemessen werden konnte. Bei dem bis-NHC Gold(I)komplex **4a** konnte nach einer Stunde ebenfalls die doppelte Menge an Fluor im Vergleich zum Gold detektiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass der bis-Komplex wahrscheinlich komplett in die Zellen aufgenommen wird und dem entsprechend mindestens während der ersten Stunde im Zellkulturmedium stabil bleibt. Die vermehrte Abnahme der intrazellulären Goldkonzentration in Bezug zum Fluorspiegel wird sehr wahrscheinlich durch die Zersetzung des Komplexes durch zelluläre Metabolisierungsprozesse ausgelöst. Das Gold wird verstärkt aus der Zelle ausgeschleust, während die Konzentration des Liganden nur sehr geringfügig abnimmt. Der mono-Komplex hingegen muss einer frühzeitigen Zersetzung- oder Umlagerungsreaktionen unterliegen, die vor der Zellaufnahme, als auch intrazellulär innerhalb der ersten Stunde bereits stattgefunden haben muss.

Festgehalten werden kann, dass die bis-NHC Gold(I)komplexe im Zellkulturmedium stabil sind, die mono-NHC Gold(I)komplexe sich dagegen bereits innerhalb der ersten Stunde zersetzen. Bei dem Zusatz von Serumalbumin gehen vor allem die mono-NHC Gold(I)komplexe eine sofortige, fast vollständige Bindung ein, während die bis-NHC Gold(I)komplexe nur in sehr geringem Maß gebunden werden. Eine Aufnahme als kompletter Komplex in die Zellen scheint für die bis-NHC Gold(I)komplexe daher plausibel, während die mono-NHC Gold(I)komplexe dissoziieren müssen, eine Möglichkeit stellt aufgrund der Versuchsergebnisse die Umlagerung zum bis-NHC Gold(I)komplex dar.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue NHC-Gold(I)komplexe mit den allgemeinen Strukturen NHC-Au-Cl und $[\text{NHC-Au-NHC}]^+\text{I}^-$ erfolgreich synthetisiert und bezüglich ihres Potentials als neue Zytostatika und antibiotisch wirksame Arzneistoffe bioanalytisch untersucht.

Es konnten neue potente Gold(I)verbindungen in den möglichen Anwendungsgebieten der neoplastischen und antibiotischen Chemotherapie gefunden werden.

Die mono-NHC Gold(I)komplexe (NHC-Au-Cl) zeigten vor allem gegenüber grampositiven Bakterienstämmen sehr gute selektive wachstumshemmende Effekte im Mikroboullion-Verdünnungstest und im Enzyminhibitionstest der bakteriellen Thioredoxinreduktase.

Die bis-NHC Gold(I)komplexe $[\text{NHC-Au-NHC}]^+\text{I}^-$ wiesen dagegen eine stärkere antiproliferative Wirkung in den Zytotoxizitätstests an humanen Tumorzellen, als auch einen unterschiedlichen Wirkmechanismus auf.

Weiterhin wurde eine Korrelation zwischen der antiproliferativen Aktivität gegenüber verschiedenen Tumorzellen, der Lipophilie der Komplexe, der Affinität zu Serumalbumin und der Zellaufnahme aufgezeigt. Detaillierte Experimente zeigten, dass die mono- und bis-NHC Gold(I)komplexe unterschiedlich stabil sind und Zersetzungs- und Umlagerungsprozesse während der Zellaufnahme wahrscheinlich sind. Strukturwirkungsbeziehungen konnten im Anwendungsgebiet der neuen Zytostatika abgeleitet werden.

In beiden Anwendungsgebieten konnten die neuen Gold(I)-Organometallkomplexe die Aktivität der Leitstrukturen, als auch der Referenzsubstanzen Auranofin und verschiedenen Antibiotika (Amikacin, Linezolid und Ciprofloxacin) übertreffen.

8 Materialien und Methoden

8.1 Geräteliste

Atomabsorptionsspektrometer	HR-CS AAS contraAA 700 mit MPE60	Analytik Jena
Autoklav	LTA 2x3x4	Zirbus Technologies
Brutschränke	INCU-line	VWR
	VORTEMP 56	Labnet
CO ₂ -Brutschränke	C 170	Binder
	CB 160	Binder
	HeraCell 240	Thermo Scientific
Elementaranalytik	Flash EA 1112	Thermo Quest
HPLC-MS	1260 Infinity	Agilent Technologies
	6120 Quadrupole (ESI+APPI)	Agilent Technologies
HPLC Säule	Zorbax SB-C18 Rapid Resolution	Agilent Technologies
Kernresonanzspektrometer	Advance DRX 400	Bruker
	Advance III 400	Bruker
	Advance II 600	Bruker
Laminar Air Flow Box	Herasafe KS 12	Thermo Scientific
	Herasafe KS 15	Thermo Scientific
Massenspektrometer	MAT 95 XL	Finnigan
Mikroskop	EVOS xl	AMG
Multilabel Reader (UV/VIS Messungen)	Victor x4	Perkin Elmer
pH Meter	SevenEasy	Mettler Toledo
Photometer	SPECORD 40	Analytik Jena
Schüttler	Vortex-Genie2	Scientific Industries
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR
Waagen	CPA2250	Sartorius
	Explorer	Ohaus
Wasseranlage	arium®	Sartorius
Wasserbad	VWB12	VWR
Zentrifugen	Compact Star CS4	VWR
	CT15RE	VWR

Tab. 22: Geräteliste

8.2 Verwendete Reagenzien

Alle Reagenzien oder Ausgangssubstanzen für Reagenzien wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei Sigma Aldrich käuflich erworben.

BSA Lösung (0,2 %)

2 mg BSA

werden in 1 mL destillierten Wasser gelöst.

BSA Lösung (40 mg/mL) für Proteinbindungsstudien

440 mg Bovine Serum Albumin

werden in 11 mL DMEM Zellkulturmedium (ohne Supplemente) gelöst.

Bradford für Proteinbestimmung

250 mg Serva Blue G

250 mL Ethanol 95 %

500 mL H_2PO_4 86 %

250 mL H_2O

werden miteinander gemischt und bei $-4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Direkt vor der Verwendung wird das raumwarme Reagenz 1:4 V/V mit destilliertem Wasser verdünnt.

DMEM (Dulbecco's Eagle Medium)

1 Flasche DMEM Zellkulturmedium (500 ml) wird mit:

25 mg Gentamycin

50 ml FCS superior (Fetal Calf Serum)

unter sterilen Bedingungen versetzt.

DTNB Lösung (10 mM)

39,635 mg DTNB

werden in 10 mL TE Puffer gelöst.

DTNB Lösung (20 mM; ethanolisch)

15,854 mg DTNB

werden auf 2 mL EtOH (absolut) kurz vor dem Einsatz gelöst.

EDTA Lösung (2 mM)

0,1576 g EDTA

werden in 500 mL destillierten Wasser gelöst.

EDTA Lösung (100 mM)

29,224 mg EDTA

werden in 1 mL destillierten Wasser gelöst und der pH Wert mit 5N NaOH auf 7,5 eingestellt.

Ethanol (70 % v/v)

70 mL Ethanol (absolut) werden mit 30 mL destillierten Wasser verdünnt.

FCS Lösung für Proteinbindungsstudien

50 mL FCS superior (Fetal Calf Serum)

werden in 500 mL DMEM Zellkulturmedium (ohne Supplemente) gelöst.

Gelatinelösung (1,5 % m/V)

15 g Gelatine (Ph. Eur.)

1 L Reinstwasser

Die Gelatine wird in der entsprechenden Wassermenge bei 37 °C im Wasserbad verflüssigt und die entstehende Lösung autoklaviert (121 °C, 30 min, 100 kPa). Die Lagerung erfolgt bei 4 °C im Kühlschrank.

Glutaraldehydlösung

500 µl 25 %ige käuflich erworbene Glutaraldehydlösung

wird mit 12,5 mL PBS Puffer verdünnt.

Kristallviolett-Lösung (m/m 0,02 %)

20 mg Kristallviolett werden in 1 L destilliertem Wasser gelöst.

McCoy's 5A Medium

1 Flasche McCoy's Zellkulturmedium (500 mL) wird mit:

25 mg Gentamycin

50 mL FCS superior (Fetal Calf Serum)

unter sterilen Bedingungen versetzt.

NADPH Lösung (20 mM)

16,667 mg NADPH (als $C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3 \cdot xH_2O$)

werden auf 1 mL destillierten Wasser gelöst.

NADPH Lösung (400 μ M)

3,3334 mg NADPH (als $C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3 \cdot xH_2O$)

werden in 10 mL TE Puffer gelöst.

PBS Puffer (pH 7,4)

8,00 g NaCl

2,00 g $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$

0,15 g $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$

0,20 g KCl

0,20 g KH_2PO_4

werden in 1 L destillierten Wasser gelöst.

Der pH Wert wurde mit 5N HCl oder 5N NaOH auf 7,4 eingestellt. Anschließend wurde der Puffer im Autoklaven sterilisiert (121 °C, 20 min).

Reaktionsmix für E.coli TrxR Inhibitionstest

5 mL NADPH Lösung (400 μ M)

5 mL DTNB Lösung (10 mM)

werden mit einander gut gemischt.

Reaktionsmix für mammalian TrxR Inhibitionstest

5,0 mL Kaliumphosphat Puffer (100 mM; pH 7,0)

0,8 mL EDTA Lösung (100 mM)

0,2 mL BSA Lösung (0,2 %)

1,0 mL NADPH Lösung (20 mM)

3,0 mL destilliertes Wasser

werden gut miteinander gemischt.

TE Puffer (pH 7,5)

500 mL Tris-HCl (100 mM)

500 mL EDTA (2 mM)

werden miteinander vermischt um 1L des Puffers, mit einer Endkonzentration von 50 mM Tris-HCl und 1 mM EDTA herzustellen. Der pH Wert wird mit 5N HCl oder 5N NaOH auf 7,5 eingestellt.

Tris-HCl Lösung (100 mM)

14,612 g Tris-HCl

werden mit 500 mL destilliertem Wasser gelöst.

Triton x-100 Lösung für AAS (1 % v/v)

1 mL Triton x-100

wird auf 100 ml Reinstwasser gelöst.

Trypsin Lösung (0,05 % v/v)

2 mL einer käuflich erworbenen 0,25 %igen Trypsinlösung werden mit 8 mL PBS Puffer unter sterilen Bedingungen verdünnt.

8.3 Allgemeine Synthesevorschriften

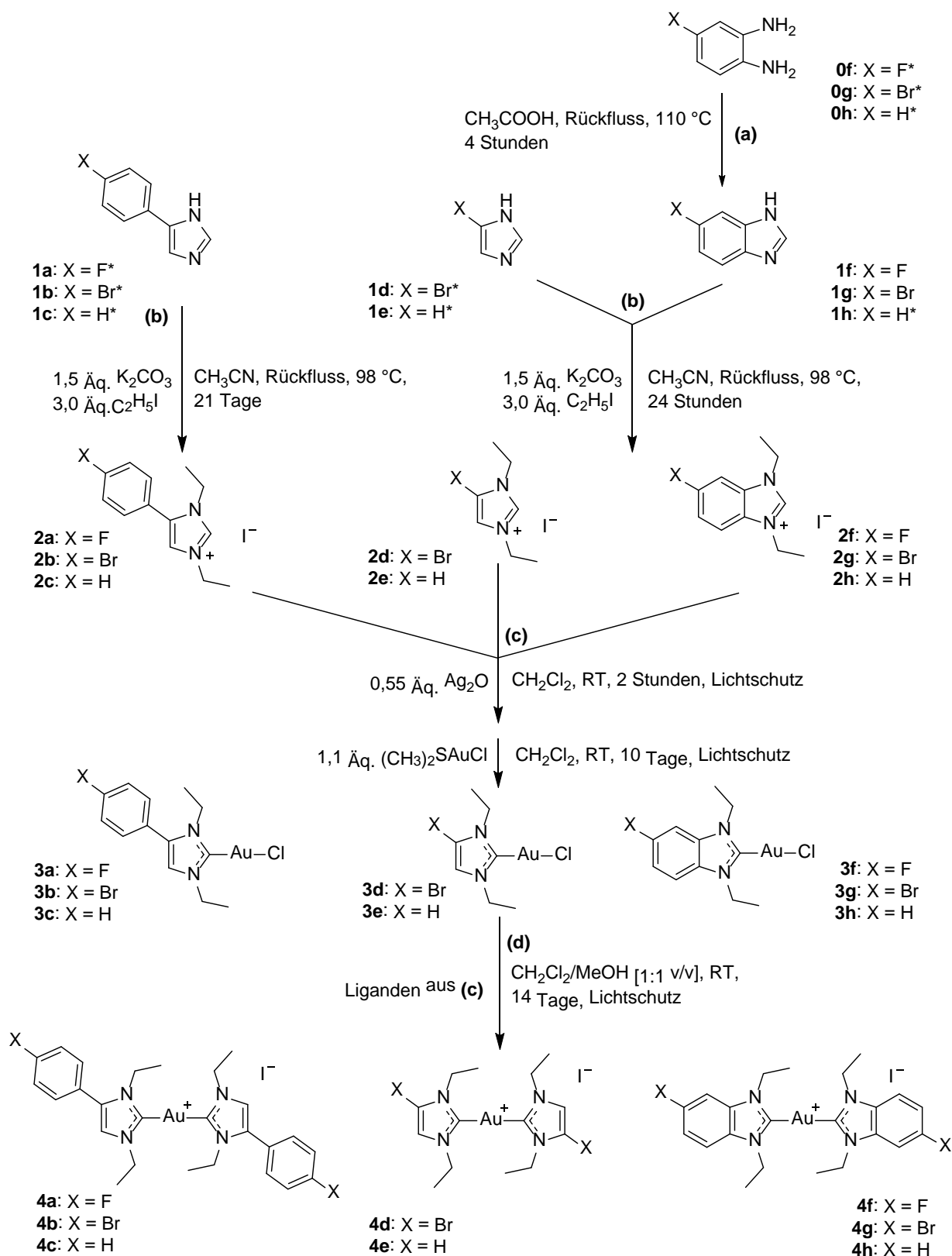


Abb. 77: Syntheschema der Vorstufen (Syntheseschritt a), der Liganden (Syntheseschritt b), mono-NHC Gold(I) Komplexe (Syntheseschritt c) und bis-NHC Gold(I) Komplexe (Syntheseschritt d), *käuflich erworben

8.3.1 Synthese der Benzimidazole (a)

Die fluorierten und bromierten Benzen-1,2-diamine werden in 40 mL konzentrierter Ameisensäure gelöst und unter Rückfluss bei 110 °C über vier Stunden gerührt. Der Reaktionskolben wird auf Eis gekühlt und der Ansatz mit konzentrierter Ammoniaklösung neutralisiert. Das Wasser wird unter Vakuum entfernt und die jeweiligen Produkte werden mit DCM als gelbe Lösungen aus dem grauen unlöslichen Ammoniumformiatrückstand extrahiert bis der Überstand farblos bleibt. Anschließend wird das Lösemittel unter verminderten Druck bis zur Trockne eingeeengt, um das saubere Produkt zu isolieren.

8.3.2 Synthese der (Benz)Imidazoliumiodide (b)

Die jeweiligen Benzimidazole bzw. (Phenyl)Imidazole werden in 20 mL Acetonitril gelöst und 1,5 Äquivalente Kaliumcarbonat als auch 3,0 Äquivalente Ethyliodid hinzugefügt. Der Ansatz wird unter Rückfluss bei 98 °C über 24 Stunden (Imidazole/Benzimidazole) bzw. 21 Tage (Phenylimidazole) gerührt. Nach der vollständigen Umsetzung wird das Lösemittel abgezogen und der Rückstand erneut in 20 mL DCM gelöst. Die Suspension wird filtriert, um den ausgefallenen Überschuss an Kaliumcarbonat/Kaliumhydrogencarbonat zu entfernen. Anschließend wird das Lösemittel erneut unter Vakuum abgezogen. Das enthaltende Produkt wird mit THF so lange gewaschen, bis der Überstand farblos bleibt. In diesem Schritt wird das überschüssige Alkylierungsmittel abgetrennt. Das feuchte Produkt wird zuerst mit dem Rotationsverdampfer eingeeengt und schließlich in der Trockenpistole unter Vakuum bei 50 °C über drei Tage getrocknet.

8.3.3 Synthese der mono-NHC Gold(I)komplexe (c)

Eine Stoffmenge von 0,29 – 0,91 mmol der jeweiligen (Benz)- bzw. (Phenyl)Imidazoliumiodide und 0,55 Äquivalente Silberoxid werden in 20 mL DCM gelöst und

für zwei Stunden bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz gerührt. Danach werden 1,1 Äquivalente Chlorido(dimethylsulfid)gold(I) dazugegeben. Nach zehn Tagen unter kontinuierlichem Rühren wird der gesamte Reaktionsansatz über eine Celite®-Säule (Lösemittel: DCM) filtriert. Die reinen Komplexe werden nach der Entfernung des Lösemittels erhalten und über drei Tage bei 50 °C unter Vakuum getrocknet.

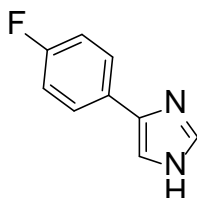
8.3.4 Synthese der bis-NHC Gold(I)komplexe (d)

Äquivalente Stoffmengen der verschiedenen mono-NHC Gold(I)komplexe und der gewünschten Liganden werden in einer 1:1-Mischung aus DCM und MeOH gelöst. Nach Zugabe von 1,5 Äquivalenten Kaliumcarbonat wird der Reaktionsansatz bei Raumtemperatur unter Lichtschutz für 14 Tage gerührt. Das Lösemittelgemisch wird abrotiert und der Rückstand wieder in reinen DCM aufgenommen. Die Suspension wird filtriert, wodurch der Überschuss an Kaliumcarbonat/Kaliumhydrogencarbonat und Chlorid abgetrennt wird. Das erhaltene Filtrat wird am Rotationsverdampfer eingeengt. Das saubere Produkt wird drei Tage bei 50 °C vakuumgetrocknet.

8.4 Charakterisierung der synthetisierten Substanzen

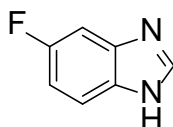
8.4.1 (Benz)imidazole

4-(4'-Fluorophenyl)-1*H*-imidazol (1a)



Käuflich erworben bei Sigma Aldrich; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm 9.86 (s, sehr breit, 1H, Im-H1), 7.69 (m, 3H, Ph-H2' + Ph-H6' + Im-H2), 7.28 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.1$ Hz, 1H, Im-H5), 7.05 (m, 2H, Ph-H3' + Ph-H5'); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm 162.0 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 245.9$ Hz, Ph-C4'quat.), 138.7 (Im-C4quat.), 135.5 (Im-C2H), 129.4 (d, $^4J_{\text{C,F}} = 3.3$ Hz, Ph-C1'quat.), 126.6 (d, 2C, $^3J_{\text{C,F}} = 8.0$ Hz, Ph-C2'H + Ph-C6'H), 115.6 (d, 2C, $^2J_{\text{C,F}} = 21.1$ Hz, Ph-C3'H + Ph-C5'H), 114.0 (Im-C5H); $^{19}\text{F-NMR}$ (1H) (376 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm -115.8 (tt, $^3J_{\text{F,H}} = 8.9$ Hz, $^4J_{\text{F,H}} = 5.5$ Hz).

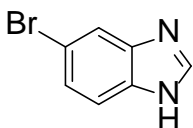
5-Fluoro-1*H*-benzimidazol (1f)



Synthese nach Vorschrift **a**; Ausgangssubstanz: 3,4-Diaminofluorobenzen (500.0 mg, 3.96 mmol), Ausbeute: 253.4 mg (1.86 mmol, 47 %), hellgelbes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm 8.12 (s, 1H, Belm-H2), 7.60 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 8.8$ Hz, $^4J_{\text{H,F}} = 4.7$ Hz, $^5J_{\text{H,H}} = 0.6$ Hz, 1H, Belm-H7), 7.34 (ddd, $^3J_{\text{H,F}} = 9.6$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$ Hz, $^5J_{\text{H,H}} = 0.6$ Hz, 1H, Belm-H4), 7.05 (ddd, $^3J_{\text{H,F}} = 9.7$ Hz, $^3J_{\text{H,H}} = 8.8$ Hz, $^4J_{\text{H,H}} = 2.5$ Hz, 1H, Belm-H6); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm 159.8 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 239.3$ Hz, Belm-C5quat.), 141.3 (Belm-C2H), 137.3 (Belm-

C3_{aquat.}), 134.1 (Belm-C7_{aquat.}), 116.3 (d, $^3J_{C,F}$ = 10.2 Hz, Belm-C7H), 111.7 (d, $^2J_{C,F}$ = 25.7 Hz, Belm-C6H), 101.4 (d, $^2J_{C,F}$ = 26.0 Hz, Belm-C4H); ^{19}F -NMR (1H) (376 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm -119.7 (td, $^3J_{F,H}$ = 9.3 Hz, $^4J_{F,H}$ = 4.7 Hz); Elementaranalyse: $\text{C}_7\text{H}_5\text{FN}_2$ (berechnet/gefunden [%]): C (61.76/61.51) H (3.70/3.86) N (20.58/20.39); MS (EI): m/z 136.1 $[\text{M}]^+$, 118.1 $[\text{M} - \text{F} + \text{H}]^+$.

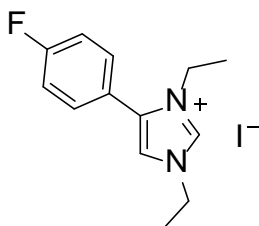
5-Bromo-1*H*-benzimidazol (1g)



Synthese nach Vorschrift **a**; Ausgangssubstanz: 4-Bromo-1,2-benzendiamin (500.0 mg, 2.67 mmol), Ausbeute: 268.3 mg (1.36 mmol, 51 %), hellgelbes Pulver, Schmelzpunkt; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm 8.10 (s, 1H, Belm-H2), 7.82 (dd, $^4J_{H,H}$ = 1.7 Hz, $^5J_{H,H}$ = 0.5 Hz, 1H, Belm-H4), 7.54 (dd, $^3J_{H,H}$ = 8.6 Hz, $^5J_{H,H}$ = 0.6 Hz, 1H, Belm-H7), 7.41 (dd, $^3J_{H,H}$ = 8.6 Hz, $^4J_{H,H}$ = 1.8 Hz, 1H, Belm-H6); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm 141.2 (Belm-C2H), 138.8 (Belm-C3_{aquat.}), 136.5 (Belm-C7_{aquat.}), 126.3 (Belm-C6H), 118.5 (Belm-C4H), 116.8 (Belm-C7H), 116.2 (Belm-C5Br_{aquat.}); Elementaranalyse: $\text{C}_7\text{H}_5\text{BrN}_2$ (berechnet/gefunden [%]): C (42.67/42.80), H (2.56/2.46), N (14.22/13.89); MS (EI): m/z 196.0 $[\text{M}]^+$, 117.0 $[\text{M} - \text{Br} + \text{H}]^+$, 116.0 $[\text{M} - \text{Br}]^+$.

8.4.2 (Benz)imidazoliumiodide

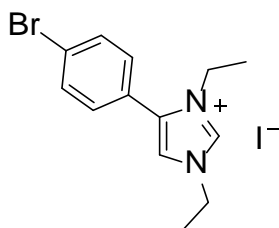
1,3-Diethyl-4-(4'-fluorophenyl)-imidazoliumiodid (2a)



Synthese nach Vorschrift **b**; Ausgangssubstanz: 4-(4'-Fluorophenyl)-1*H*-imidazol (500.0 mg, 3.08 mmol), Ausbeute: 533.1 mg (1.54 mmol, 50 %), hellgelbes Pulver; ^1H -NMR (400 MHz,

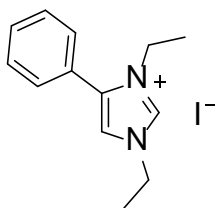
CDCl₃-*d*₇) δ ppm 10.34 (d, ⁴*J*_{H,H} = 1.9 Hz, 1H, Im-H2), 7.48 (m, 2H, Ph-H2' + Ph-H6'), 7.35 (d, ⁴*J*_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, Im-H5), 7.25 (m, 2H, Ph-H3' + Ph-5'), 4.51 (q, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 4.29 (q, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.68 (t, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 1.52 (t, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 3H, CH₃); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*₇) δ ppm 164.0 (d, ¹*J*_{C,F} = 253.1 Hz, Ph-C4'F_{quat.}), 136.5 (Im-C2H), 134.2 (Im-C4_{quat.}), 131.8 (d, 2C, ³*J*_{C,F} = 8.7 Hz, Ph-C2'H + Ph-C6'H), 120.8 (d, Ph-C'1_{quat.}, ⁴*J*_{C,F} = 3.6 Hz), 119.2 (Im-C5H), 116.9 (d, 2C, ²*J*_{C,F} = 21.9 Hz, Ph-C3'H + Ph-C5'H), 45.6 (CH₂), 43.3 (CH₂), 15.7 (CH₃), 15.5 (CH₃); ¹⁹F -NMR (1H) (376 MHz, CDCl₃-*d*₇) δ ppm -108.7 (tt, ³*J*_{F,H} = 8.3 Hz, ⁴*J*_{F,H} = 5.1 Hz); Elementaranalyse: C₁₃H₁₆FIN₂ (berechnet/gefunden [%]): C (45.10/45.12), H (4.66/4.65), N (8.09/7.99); MS (ESI): *m/z* 219.1 [M-I]⁺.

4-(4'-Bromophenyl)-1,3-diethyl-imidazoliumiodid (2b)



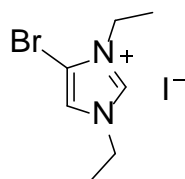
Synthese nach Vorschrift **b**; Ausgangssubstanz: 4-(4'-Bromophenyl)-1*H*-imidazol (500.0 mg, 2.24 mmol), Ausbeute: 419.5 mg (1.03 mmol, 46 %), hellgelbes Pulver; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₇) δ ppm 10.38 (dd, ⁴*J*_{H,H} = 1.8 Hz, 1H, Im-H2), 7.69 (m, 2H, Ph-H_{ortho}/Ph-H_{meta}), 7.35 (m, 3H, Ph-H_{ortho}/Ph-H_{meta} + Im-H5), 4.51 (q, ³*J*_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 4.30 (q, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.68 (t, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 1.53 (t, ³*J*_{H,H} = 7.3 Hz, 3H, CH₃); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*₇) δ ppm 136.8 (Im-C2H), 134.1 (Im-C4_{quat.}), 132.8 (2C, Ph-C3'H + Ph-C5'H), 131.1 (2C, Ph-C2'H + Ph-C6'H), 125.6 (Ph-C1'_{quat.}), 123.7 (Ph-C4'Br_{quat.}), 119.1 (Im-C5H), 45.7 (CH₂), 43.5 (CH₂), 15.7 (CH₃), 15.5 (CH₃); Elementaranalyse: C₁₃H₁₆BrIN₂ (berechnet/gefunden [%]): C (38.36/38.52), H (3.96/4.04), N (6.88/6.68); MS (ESI): *m/z* 279.0 [M-I]⁺.

1,3-Diethyl-4-phenylimidazoliumiodid (2c)



Synthese nach Vorschrift **b**; Ausgangssubstanz: 4-Phenylimidazol (250.0 mg, 1.73 mmol), Ausbeute: 369.1 mg (1.21 mmol, 70 %), hellgelbes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 10.44 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, Im-H2, 1H), 7.53 (m, Ph-H3 + Ph-H4 + Ph-H5, 3H), 7.43 (m, Ph-H2 + Ph-H6, 2H), 7.30 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.8$ Hz, Im-H5, 1H), 4.52 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 4.32 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 1.70 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.52 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 136.6 (Im-C2H), 135.3 (Im-C4_{quat.}), 130.8 (Ph-C4H), 129.5 (4C, Ph-C2H + Ph-C3H + Ph-C5H + Ph-C6H), 124.8 (Ph-C1_{quat.}), 118.7 (Im-C5H), 45.6 (CH_2), 43.3 (CH_2), 15.8 (CH_3), 15.5 (CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{IN}_2$ (berechnet/gefunden [%]): C (47.58/47.53), H (5.22/5.25), N (8.54/8.48); MS (ESI): m/z 201.1 $[\text{M-I}]^+$.

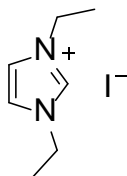
4-Bromo-1,3-diethyl-imidazoliumiodid (2d)



Synthese nach Vorschrift **b**; Ausgangssubstanz: 5-Bromo-1*H*-imidazol (500.0 mg, 3.40 mmol), Ausbeute: 945.3 mg (2.86 mmol, 84 %), hellgelbes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm: 10.49 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 2.0$, 1H, Im-H2), 7.64 (d, $^4J_{\text{H,H}} = 1.9$ Hz, 1H, Im-H5), 4.52 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 4.39 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 1.66 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.65 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 137.4 (Im-C2H), 122.0 (Im-C4Br_{quat.}), 107.6 (Im-C5H), 46.3 (CH_2), 44.8 (CH_2), 15.5 (CH_3), 15.2 (CH_3);

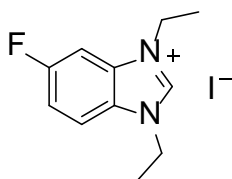
Elementaranalyse: C₇H₁₂BrIN₂ (berechnet/gefunden [%]): C (25.40/25.50), H (3.65/3.54), N (8.46/8.30); MS (ESI): m/z 203.0 [M-I]⁺.

1,3-Diethyl-imidazoliumiodid (2e)



Synthese nach Vorschrift **b**; Ausgangssubstanz: Imidazol (250.0 mg, 3.67 mmol), Ausbeute: 634.3 mg (2.53 mmol, 69 %), hellgelbes Pulver; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d₇) δ ppm 10.20 (m, 1H, Im-H2), 7.49 (d, 2H, ⁴J_{H,H} = 1.7 Hz, Im-H4 + Im-H5), 4.45 (q, 4H, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, CH₂), 1.64 (t, 6H, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, CH₃) ; ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃-d₇) δ ppm 136.1 (Im-C2H), 121.8 (2C, Im-C4H + Im-C5H), 45.5 (2C, CH₂), 15.6 (2C, CH₃); Elementaranalyse: C₇H₁₃IN₂ (berechnet/gefunden [%]): C (33.35/33.42), H (5.20/5.24), N (11.11/11.02); MS (ESI): m/z 125.1 [M-I]⁺.

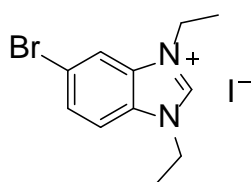
1,3-Diethyl-5-fluoro-benzimidazoliumiodid (2f)



Synthese nach Vorschrift **b**; Ausgangssubstanz: 5-Fluoro-1*H*-benzimidazol (500.0 mg, 3.67 mmol), Ausbeute: (963.5 mg, 3.01 mmol, 82 %), helles lachsfarbenes Pulver; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d₇) δ ppm 11.12 (s, 1H, Belm-H2), 7.78 (ddd, ³J_{H,H} = 9.0, ⁴J_{H,F} = 4.1 Hz, ⁵J_{H,H} = 0.7, 1H, Belm-H7), 7.45 (m, 2H, Belm-H4 + Belm-H6), 4.71 (q, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 2H, CH₂), 4.66 (q, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 2H, CH₂), 1.78 (t, ³J_{H,H} = 7.4 Hz, 3H, CH₃), 1.76 (t, ³J_{H,H} = 7.5 Hz, 3H, CH₃); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃-d₇) δ ppm 161.5 (d, ¹J_{C,F} = 251.0 Hz, Belm-C5F_{quat.}), 142.6 (Belm-

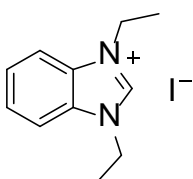
C2H), 131.9 (d, $^3J_{C,F} = 12.7$ Hz, Belm-C3a_{quat.}), 127.7 (Belm-C7a_{quat.}), 116.3 (d, $^2J_{C,F} = 26.3$ Hz, Belm-C4/6H), 114.7 (d, $^3J_{C,F} = 10.2$ Hz, Belm-C7H), 100.1 (d, $^2J_{C,F} = 28.1$ Hz, Belm-C4/6H), 45.5 (CH₂), 43.4 (CH₂), 14.9 (CH₃), 14.7 (CH₃); ^{19}F -NMR (1H) (376 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ ppm -110.5 (td, $^3J_{F,H} = 8.6$ Hz, $^4J_{F,H} = 4.1$ Hz); Elementaranalyse: C₁₁H₁₄FIN₂ (berechnet /gefunden [%]): C (41.27/41.42), H (4.41/4.27), N (8.75/8.55); MS (ESI): *m/z* 193.1 [M-I]⁺.

5-Bromo-1,3-diethyl-benzimidazoliumiodid (2g)



Synthese nach Vorschrift **b**; Ausgangssubstanz: 5-Bromo-1*H*-benzimidazol (500.0 mg, 2.54 mmol), helles lachsfarbenes Pulver, Ausbeute: 677.5 mg (1.78 mmol, 70 %); ^1H -NMR (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ ppm 11.14 (s, 1H, Belm-H2), 7.91 (dd, $^4J_{H,H} = 1.6$, $^5J_{H,H} = 0.6$ Hz, 1H, Belm-H4), 7.78 (dd, $^3J_{H,H} = 8.8$, $^4J_{H,H} = 1.7$ Hz, 1H, Belm-H6), 7.68 (dd, $^3J_{H,H} = 8.8$, $^5J_{H,H} = 0.6$ Hz, 1H, Belm-H7), 4.70 (q, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, CH₂), 4.67 (q, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 2H, CH₂), 1.79 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, CH₃), 1.78 (t, $^3J_{H,H} = 7.4$ Hz, 3H, CH₃); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl₃-*d*₁) δ ppm 142.3 (Belm-C2H), 132.2 (Belm-C3a_{quat.}), 130.7 (Belm-C7H), 130.2 (Belm-C7a_{quat.}), 120.8 (Belm-C5Br_{quat.}), 116.1 (Belm-C6H), 114.5 (Belm-C4H), 43.4 (CH₂), 43.3 (CH₂), 14.8 (CH₃), 14.8 (CH₃); Elementaranalyse: C₁₁H₁₄BrIN₂ (berechnet/gefunden [%]): C (34.67/34.89), H (3.70/3.42), N (7.35/6.96); MS (ESI): *m/z* 253.0 [M-I]⁺.

1,3-Diethyl-benzimidazoliumiodid (2h)

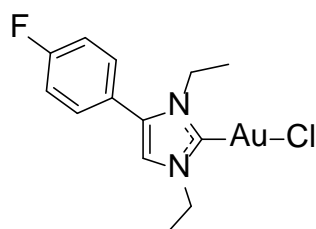


Synthese nach Vorschrift **b**; Ausgangssubstanz: Benzimidazol (250.0 mg, 2.12 mmol), Ausbeute: 526.8 mg (1.74 mmol, 82 %), hellgelbes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ ppm 11.09 (s, Belm-H2, 1H), 7.78 (m, Belm-H5 + Belm-H6, 2H), 7.69 (m, Belm-H4 + Belm-H7, 2H), 4.71 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 4H, CH_2), 1.78 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 6Hn CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3-d_1) δ ppm 141.3 (Belm-C2H), 131.2 (2C, Belm-C3a_{quat.} + Belm-C7a_{quat.}), 127.3 (2C, Belm-C5H + Belm-C6H), 113.1 (2C, Belm-C4H + Belm-C7H), 43.0 (2C, CH_2), 14.9 (2C, CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{IN}_2$ (berechnet/gefunden [%]): C (43.73/43.67), H (5.00/5.07), N (9.27/9.24); MS (ESI): m/z 175.1 $[\text{M-I}]^+$.

8.4.3 Mono-NHC Gold(I)komplexe

(allgemeines Schema: NHC-Au-Cl)

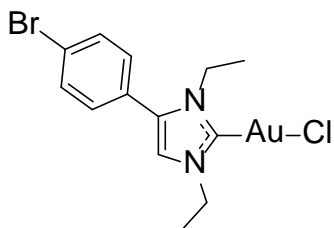
Chlorido[1,3-diethyl-4-(4'-fluorophenyl)-imidazol-2-ylidene]gold(I) (**3a**)



Synthese nach Vorschrift **c**; Ausgangssubstanz: 1,3-Diethyl-4-(4'-fluorophenyl)-imidazoliumiodid (100.0 mg, 0.29 mmol), Ausbeute: 101.8 mg (0.23 mmol, 78 %); gelbes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_1) δ ppm 7.35 (m, 2H, Ph-H2' + Ph-H6'), 7.19 (m, 2H, Ph-H3' + Ph-H5'), 6.90 (s, 1H, Im-H5), 4.27 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 4.18 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.52 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.31 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 3H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3-d_1) δ ppm 170.5 (Im-C2_{quat.}), 165.8 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 251.5$ Hz, Ph-C4'_{quat.}), 133.4 (Im-C4_{quat.}), 131.4 (d, 2C, $^3J_{\text{C,F}} = 8.4$ Hz, Ph-C2'H + Ph-C6'H), 123.7 (d, 2C, $^4J_{\text{C,F}} = 3.7$ Hz, Ph-C1'_{quat.}), 117.9 (Im-C5H), 116.3 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 21.9$ Hz, Ph-C3'H + Ph-C5'H), 46.8 (CH_2), 44.0

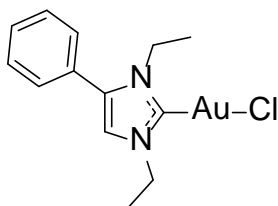
(CH₂), 16.9 (CH₃), 16.4 (CH₃); ¹⁹F -NMR (1H) (376 MHz, CDCl₃-d₇) δ ppm -110.7 (tt, ³J_{F,H} = 8.3 Hz, ⁴J_{F,H} = 5.2 Hz, 1F); Elementaranalyse: C₁₃H₁₅AuClFN₂ (berechnet/gefunden [%]): C (34.65/34.44), H (3.35/3.31), N (6.22/6.06); MS (EI): m/z 450.0 [M⁺], 415.1 [M-Cl]⁺.

Chlorido[4-(4'-bromophenyl)-1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene]gold(I) (**3b**)



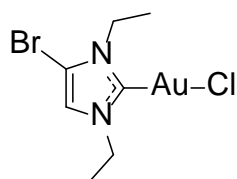
Synthese nach Vorschrift **c**; Ausgangssubstanz: 4-(4'-Bromophenyl)-1,3-diethyl-imidazoliumiodid (300.0 mg, 0.74 mmol), Ausbeute: 325.6 mg (0.64 mmol, 86 %), gelbes Pulver; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃-d₇) δ ppm 7.63 (m, 2H, Ph-H_{ortho/meta}), 7.23 (m, 2H, Ph-H_{ortho/meta}), 6.91 (s, 1H, Im-H5), 4.24 (q, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 4.19 (q, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 2H, CH₂), 1.52 (t, ³J_{H,H} = 7.3 Hz, 3H, CH₃), 1.32 (t, ³J_{H,H} = 7.2 Hz, 3H, CH₃); ¹³C-NMR (101 MHz, CDCl₃-d₇) δ ppm 170.9 (Im-C2_{quat.}), 133.3 (Im-C4_{quat.}), 132.4 (2C, Ph-C3'H + Ph-C5'H), 130.4 (2C, Ph-C2'H + Ph-C6'H), 126.5 (Ph-C1'_{quat.}), 124.3 (Ph-C4'Br_{quat.}), 117.9 (Im-C5H), 46.8 (CH₂), 44.1 (CH₂), 16.9 (CH₃), 16.4 (CH₃); Elementaranalyse: C₁₃H₁₅AuBrClN₂ (berechnet/gefunden [%]): C (30.52/30.35), H (2.96/2.65), N (5.48/5.30); MS (EI): m/z 510.0 [M]⁺, 475.0 [M-Cl]⁺.

Chlorido(1,3-diethyl-4-phenylimidazol-2-ylidene)]gold(I) (**3c**)



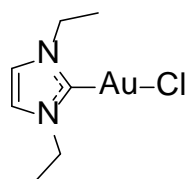
Synthese nach Vorschrift **c**; Ausgangssubstanz: 1,3-Diethyl-4-phenylimidazol-2-iumiodid (240.0 mg, 0.73 mmol), Ausbeute: 263.0 mg (0.64 mmol, 83 %), helles rot-braunes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm 7.49 (m, Ph-H3 + Ph-H4 + Ph-H5, 3H), 7.36 (m, Ph-H2 + Ph-H6, 2H), 6.90 (s, 1H), 4.32 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 4.21 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.52 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.32 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 3H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm 170.3 (Im-C2_{quat.}), 134.5 (Im-C4_{quat.}), 129.7 (Ph-C4H), 129.3 (4C, Ph-C2H + Ph-C3H + Ph-C5H + Ph-C6H), 127.7 (Ph-C1_{quat.}), 117.7 (Im-C5H), 46.8 (CH_2), 44.0 (CH_2), 17.0 (CH_3), 16.5 (CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{IAuClN}_2$ (berechnet/gefunden [%]): C (36.09/36.61), H (3.73/3.66), N (6.47/6.30); MS (ESI): m/z 432.1 $[\text{M}^+]$, 397.1 $[\text{M-Cl}]^+$.

Chlorido(4-bromo-1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)gold(I) (**3d**)



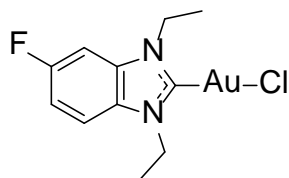
Synthese nach Vorschrift **c**; Ausgangssubstanz: 4-Bromo-1,3-diethyl-imidazoliumiodid (300.0 mg, 0.91 mmol), Ausbeute: 325 mg (0.75 mmol, 82 %), orange-braunes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm 6.98 (s, 1H, Im-H5), 4.29 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 4.24 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.48 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, CH_3), 1.45 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm 171.8 (Im-C2_{quat.}), 120.1 (Im-C4Br_{quat.}), 104.7 (Im-C5H), 47.4 (CH_2), 45.8 (CH_2), 16.3 (CH_3), 16.1 (CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_7\text{H}_{11}\text{AuBrClN}_2$ (berechnet /gefunden [%]): C (19.31/19.06), H (2.55/2.16) N (6.43/5.99); MS (EI): m/z 433.9 $[\text{M}]^+$, 399.0 $[\text{M-Cl}]^+$.

Chlorido(1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)]gold(I) (3e)



Synthese nach Vorschrift c; Ausgangssubstanz: 1,3-Diethyl-imidazol-2-iumiodid (240.0 mg, 0.952 mmol), Ausbeute: 269.9 mg (0.762 mmol, 80 %), hell graues Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 6.96 (s, 2H, Im-H4 + Im-H5), 4.23 (q, 4H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, CH_2), 1.47 (t, 6H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 169.8 (Im-C2H), 119.9 (2C, Im-C4H + Im-C5H), 46.5 (2C, CH_2), 16.5 (2C, CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{AuClN}_2$ (berechnet/gefunden [%]): C (7.86/7.64), H (3.39/3.27), N (7.86/7.64); MS (ESI): m/z 356.0 $[\text{M}]^+$, 321.1 $[\text{M-Cl}]^+$.

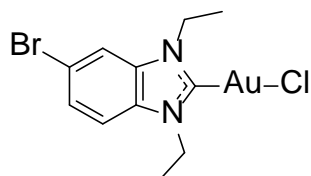
Chlorido(1,3-diethyl-5-fluoro-benzimidazol-2-ylidene)]gold(I) (3f)



Synthese nach Vorschrift c; Ausgangssubstanz: 1,3-Diethyl-5-fluoro-benzimidazoliumiodid (100.0 mg 0.31 mmol), Ausbeute: 114.5 mg (0.27 mmol, 87 %), hellgelbes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 7.43 (ddd, $^3J_{\text{H,H}} = 9.5$, $^4J_{\text{H,F}} = 4.2$ Hz, $^5J_{\text{H,H}} = 0.4$ Hz, 1H, Belm-H7), 7.20 (m, 2H, Belm-H4 + Belm-H6), 4.53 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 2H, CH_2), 4.50 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 2H, CH_2), 1.54 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.53 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 3H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 178.9 (Belm-C2_{quat.}), 160.4 (d, $^1J_{\text{C,F}} = 244.9$ Hz, Belm-C5_{quat.}), 133.3 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 12.7$ Hz, Belm-C3_{quat.}), 129.2 (Belm-C7_{quat.}), 112.7 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 25.8$ Hz, Belm-C4/6H), 112.3 (d, $^3J_{\text{C,F}} = 10.0$ Hz, Belm-C7H), 98.6 (d, $^2J_{\text{C,F}} = 27.6$ Hz, Belm-C4/6H), 44.2 (CH_2), 44.1 (CH_2), 15.5 (CH_3), 15.3 (CH_3); $^{19}\text{F-NMR}$ (1H) (376 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm -

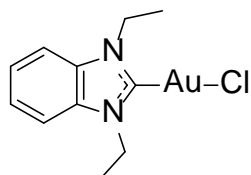
116.31 (td, $^3J_{F,H} = 8.6$ Hz, $^4J_{F,H} = 4.2$ Hz; Elementaranalyse: $C_{11}H_{13}AuClFN_2$ (berechnet /gefunden [%]): (C 31.11/30.62), H (3.09/2.76), N (6.60/6.34); MS (EI): m/z 424.0 $[M]^+$, 389.0 $[M-Cl]^+$.

Chlorido(5-Bromo-1,3-diethyl-benzimidazol-2-ylidene)gold(I) (3g)



Synthese nach Vorschrift c; Ausgangssubstanz: 5-Bromo-1,3-diethyl-benzimidazoliumiodid (300.0 mg, 0.78 mmol), Ausbeute: 333.3 mg (0.69 mmol, 88 %), hellgelbes Pulver; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ ppm 7.65 (dd, $^4J_{H,H} = 1.7$, $^5J_{H,H} = 0.5$ Hz, 1H, Belm-H4), 7.55 (dd, $^3J_{H,H} = 8.7$, $^4J_{H,H} = 1.7$ Hz, 1H, Belm-H6), 7.36 (dd, $^3J_{H,H} = 8.6$, $^5J_{H,H} = 0.5$ Hz, 1H, Belm-H7), 4.52 (q, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 4.50 (q, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, 2H, CH_2), 1.54 (t, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, 3H, CH_3), 1.53 (t, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, 3H, CH_3); ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ ppm 178.9 (BelmC2_{quat.}), 133.9 (BelmC3_{aquat.}), 131.8 (BelmC7_{aquat.}), 127.7 (BelmC7H), 118.0 (BelmC5Br_{quat.}), 114.5 (BelmC6H), 112.6 (BelmC4H), 44.2 (CH_2), 44.1 (CH_2), 15.5 (CH_3), 15.4 (CH_3); Elementaranalyse: $C_{11}H_{13}AuBrClN_2$ (berechnet/gefunden [%]): C (27.21/26.80), H (2.70/2.58), N (5.77/5.42); MS (EI): m/z 484.0 $[M]^+$, 449.0 $[M-Cl]^+$.

Chlorido(1,3-Diethyl-benzimidazol-2-ylidene)]gold(I) (3h) [274]



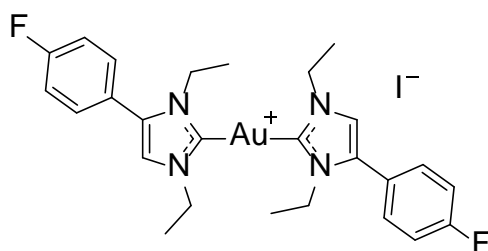
Synthese nach Vorschrift c; Ausgangssubstanz: 1,3-Diethyl-benzimidazol-2-iumiodid (240.0 mg, 0.79 mmol), Ausbeute: 281.0 mg (0.70 mmol, 87 %), helles rot-braunes Pulver; 1H -NMR

(400 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm 7.49 (dt, Belm-H4 + Belm-H7, 2H), 7.69 (dt, Belm-H5 + Belm-H6, 2H), 4.54 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 4H, CH_2), 1.54 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 6H CH_3); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm 171.7 (Belm-C2H), 132.8 (2C, Belm-C3a_{quat.} + Belm-C7a_{quat.}), 124.4 (2C, Belm-C5H + Belm-C6H), 111.3 (2C, Belm-C4H + Belm-C7H), 43.9 (2C, CH_2), 15.4 (2C, CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{IN}_2$ (berechnet/gefunden [%]): C (32.49/32.00), H (3.47/3.37), N (6.89/6.64); MS (ESI): m/z 406.1 $[\text{M}]^+$, 371.1 $[\text{M}-\text{Cl}]^+$.

8.4.4 Bis-NHC Gold(I)komplexe

(allgemeines Schema: $[\text{NHC-Au-NHC}]^+\text{I}^-$)

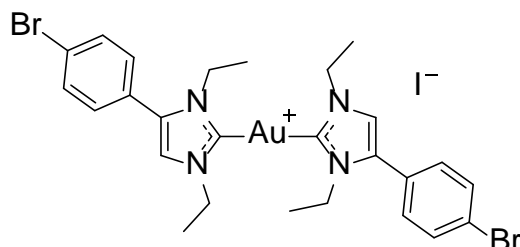
[Bis(4-(4'-fluorophenyl)-1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)]gold(I)iodid (**4a**)



Synthese nach Vorschrift **d**; Ausgangssubstanzen: Chlorido(4-(4'-fluorophenyl)-1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)]gold(I) (120.0 mg, 0.27 mmol) und (4-(4'-Fluorophenyl)-1,3-diethyl-imidazoliumiodid (92.2 mg, 0.20 mmol), Ausbeute: 151.8 mg (0.20 mmol, 73 %), weißes Pulver; ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm 7.42 (m, 4H, Ph-H2' + Ph-H6'), 7.20 (m, 6H, Ph-H3' + Ph-H5' + Im-5H), 4.42 (q, 4H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, CH_2), 4.26 (q, 4H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, CH_2), 1.62 (t, 6H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, CH_3), 1.40 (t, 6H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, CH_3); ^{13}C -NMR (101 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm 183.6 (2C, Im-C2_{quat.}), 163.4 (d, 2C, $^1J_{\text{C,F}} = 250.8$ Hz, Ph-C4'F_{quat.}), 133.8 (2C, Im-C4_{quat.}), 131.6 (d, 4C, $^3J_{\text{C,F}} = 8.5$ Hz, Ph-C2'H + Ph-C6'H), 123.4 (d, 2C, $^4J_{\text{C,F}} = 3.5$ Hz, Ph-C1'_{quat.}), 119.3 (2C, Im-C5H), 116.3 (d, 4C, $^2J_{\text{C,F}} = 21.9$ Hz, Ph-C3'H + Ph-C5'H), 47.3 (2C, CH_2), 44.0 (2C, CH_2), 17.5 (2C, CH_3), 17.2 (2C, CH_3); ^{19}F -NMR (377 MHz, CDCl_3 - d_7) δ ppm -

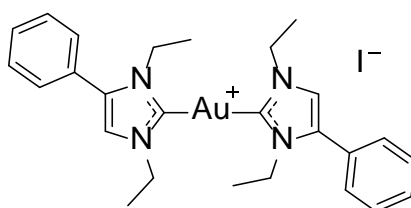
110.8 (tt, $^3J_{F,H} = 8.3$ Hz, $^4J_{F,H} = 5.2$ Hz, 2F); Elementaranalyse: $C_{26}H_{30}AuF_2IN_4$ (berechnet /gefunden [%]): C (41.07/41.38), H (3.98/4.05), N (7.37/7.17); MS (ESI): m/z 633.2 $[M-I]^+$.

[Bis(4-(4-bromophenyl)-1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)]gold(I)iodid (**4b**)



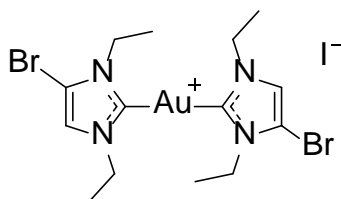
Synthese nach Vorschrift **d**; Ausgangssubstanzen: Chlorido(4-(4-bromophenyl)-1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)]gold(I) (120.0 mg, 0.23 mmol) und (4-(4-Bromophenyl)-1,3-diethyl-imidazoliumiodid (95.5 mg, 0.23 mmol), Ausbeute: 163.5 mg (0.18 mmol, 79 %), weißes Pulver; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ ppm 7.64 (m, 4H, Ph-H2' + Ph-H6'), 7.31 (m, 4H, Ph-H3' + Ph-H5'), 7.21 (s, 2H, Im-H5), 4.42 (q, 4H, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, CH_2), 4.28 (q, 4H, $^3J_{H,H} = 7.3$ Hz, CH_2), 1.61 (t, 6H, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, CH_3), 1.41 (t, 6H, $^3J_{H,H} = 7.2$ Hz, CH_3); ^{13}C -NMR (101 MHz, $CDCl_3-d_1$) δ ppm 183.9 (2C, Im-C2_{quat.}), 133.7 (2C, Im-C4_{quat.}), 132.4 (4C, Ph-C3H + Ph-C5H), 131.0 (4C, Ph-C2H + Ph-C6H), 126.3 (2C, Ph-C1_{quat.}), 124.2 (2C, Ph-C4Br_{quat.}), 119.4 (2C, Im-C5H), 47.1 (2C, CH_2), 44.2 (2C, CH_2), 17.5 (2C, CH_3), 17.0 (2C, CH_3); Elementaranalyse: $C_{26}H_{30}AuBr_2IN_4$ (berechnet /gefunden [%]): C (35.40/35.71), H (3.43/3.45), N (6.35/6.19); MS (ESI): m/z 753.0 $[M-I]^+$.

[Bis(1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)]gold(I)iodid (**4c**)



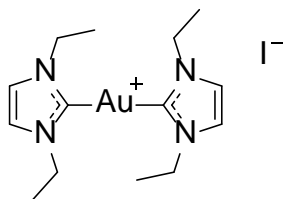
Synthese nach Vorschrift **d**; Ausgangssubstanzen: Chlorido(1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)]gold(I) (120.0 mg, 0.28 mmol) und 1,3-Diethyl-imidazoliumiodid (91.0 mg, 0.28 mmol), Ausbeute: 173,2 mg (0.24 mmol, 86 %), weißes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 7.50 (m, 6H, Ph-H3 + Ph-H4 + Ph-H5), 7.41 (m, 4H, Ph-H2 + Ph-H6), 7.17 (s, 2H, Im-H5), 4.43 (q, 4H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, CH_2), 4.27 (q, 4H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, CH_2), 1.62 (t, 6H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, CH_3), 1.43 (t, 6H, $^3J_{\text{H,H}} = 7.2$ Hz, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 183.5 (2C, Im-C2_{quat.}), 135.0 (2C, Im-C4_{quat.}), 129.7 (2C, Ph-C4H), 129.5 (4C, Ph-C3H + Ph-C5H), 129.1 (4C, Ph-C2H + Ph-C6H), 127.4 (2C, Ph-C1_{quat.}), 119.0 (2C, Im-C5H), 47.1 (2C, CH_2), 44.0 (2C, CH_2), 17.6 (2C, CH_3), 17.1 (2C, CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_{26}\text{H}_{32}\text{AuIN}_4$ (berechnet /gefunden [%]): C (43.11/43.47), H (4.45/4.34), N (7.73/7.59); MS (ESI): m/z 597.2 $[\text{M-I}]^+$.

[Bis(4-bromo-1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)]gold(I)iodid (**4d**)



Synthese nach Vorschrift **d**; Ausgangssubstanzen: Chlorido(4-bromo-1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)gold(I) (120.0 mg, 0.28 mmol) und 4-Bromo-1,3-diethyl-imidazoliumiodid (91.2 mg, 0.28 mmol), Ausbeute: 131.5 mg (0.18 mmol, 66 %), hellgelbes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 7.27 (s, 2H, Im-H5), 4.41 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 4H, CH_2), 4.36 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 4H, CH_2), 1.56 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 6H, CH_3), 1.51 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 6H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3-d_7) δ ppm 184.2 (2C, Im-C2_{quat.}), 121.1 (2C, Im-C5H), 105.5 (2C, Im-C4Br_{quat.}), 47.6 (2C, CH_2), 45.7 (2C, CH_2), 16.6 (2C, CH_3), 16.4 (2C, CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{AuBr}_2\text{IN}_4$ (berechnet /gefunden [%]): C (23.03/23.50), H (3.04/2.97), N (7.67/ 7.67); MS (ESI): m/z 603.0 $[\text{M-I}]^+$.

[Bis(1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)]gold(I)iodid (**4e**)



Synthese nach Vorschrift d; Ausgangssubstanzen: Chlorido(1,3-diethyl-imidazol-2-ylidene)gold(I) (120.0 mg, 0.34 mmol) und 1,3-Diethyl-imidazoliumiodid (84.8 mg, 0.34 mmol), Ausbeute: 141.7 mg (0.25 mmol, 74 %), weißes Pulver; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm 7.25 (s, 4H, Im-H4 + Im-H5), 4.31 (q, $^3J_{\text{H,H}} = 7.3$ Hz, 8H, CH_2), 1.55 (t, $^3J_{\text{H,H}} = 7.4$ Hz, 12H, CH_3); $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, CDCl_3 - d_1) δ ppm 182.4 (2C, Im-C2_{quat.}), 121.2 (4C, Im-C5H), 46.6 (4C, CH_2), 17.1 (4C, CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{AuIN}_4$ (berechnet /gefunden [%]): C (29.38/29.57), H (4.23/4.17), N (9.79/ 9.64); MS (ESI): m/z 445.2 $[\text{M-I}]^+$.

8.5 Allgemeine Zellkultur

8.5.1 Passagieren der Zellen

HT-29, MDA-MB-231, MCF-7 Zellen werden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvat), supplementiert mit Gentamycin (50 mg/L) und fetalem Kälberserum (FCS superior, standardisiert, Biochrom GmbH, Berlin) (10 % v/v) gezüchtet und einmal die Woche passagiert. RC-124 Zellen werden in McCoy's 5A Medium (modifiziert, mit L-Glutamin) ebenfalls mit Gentamycin (50 mg/L) und FCS superior (standardisiert, Biochrom GmbH, Berlin) (10 % v/v) supplementiert und ebenfalls einmal die Woche passagiert.

Die Zellkulturgefäße der gesunden RC-124 Nierenzellen werden vor der Verwendung modifiziert. Dazu werden 7,5 mL einer 1,5 %igen Gelatinelösung in eine neue 75 cm² Zellkulturfalsche gegeben, gleichmäßig verteilt und 60 Minuten im Brutschrank inkubiert. Danach wird der Überstand abgesaugt und die Gelatineschicht einmal mit PBS (pH 7,4 steril) in entsprechender Menge gewaschen. Wenn die Flaschen nicht sofort für die Passage verwendet werden, kann die Gelatine mit 10 mL Zellkulturmedium oder PBS vor dem Austrocknen geschützt werden.

Zum Splitten der Zellen wird das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 mL PBS (steril) gewaschen und mit 2 mL Trypsinlösung (0,05 %, enthält 0,02 % EDTA) überschichtet. Nach einer gleichmäßigen Verteilung wird das überschüssige Trypsin abgesaugt und die Zellen im Brutschrank für ca. drei min inkubiert, damit die Zell-Zell-Kontakte als auch die Zell-Gefäß-Kontakte voneinander abgelöst werden. Die anschließende Zugabe von 10 mL des entsprechenden Mediums inaktiviert das Trypsin, sodass die Zellwände nicht permeabel werden. Die Zellen werden vorsichtig mit der Pipette von der Gefäßwand gespült und

vereinzelt. Ein zellspezifisches Volumen wird in eine neue Flasche mit 10 mL vorgelegten Medium überführt und im Brutschrank inkubiert (Abb. 79).

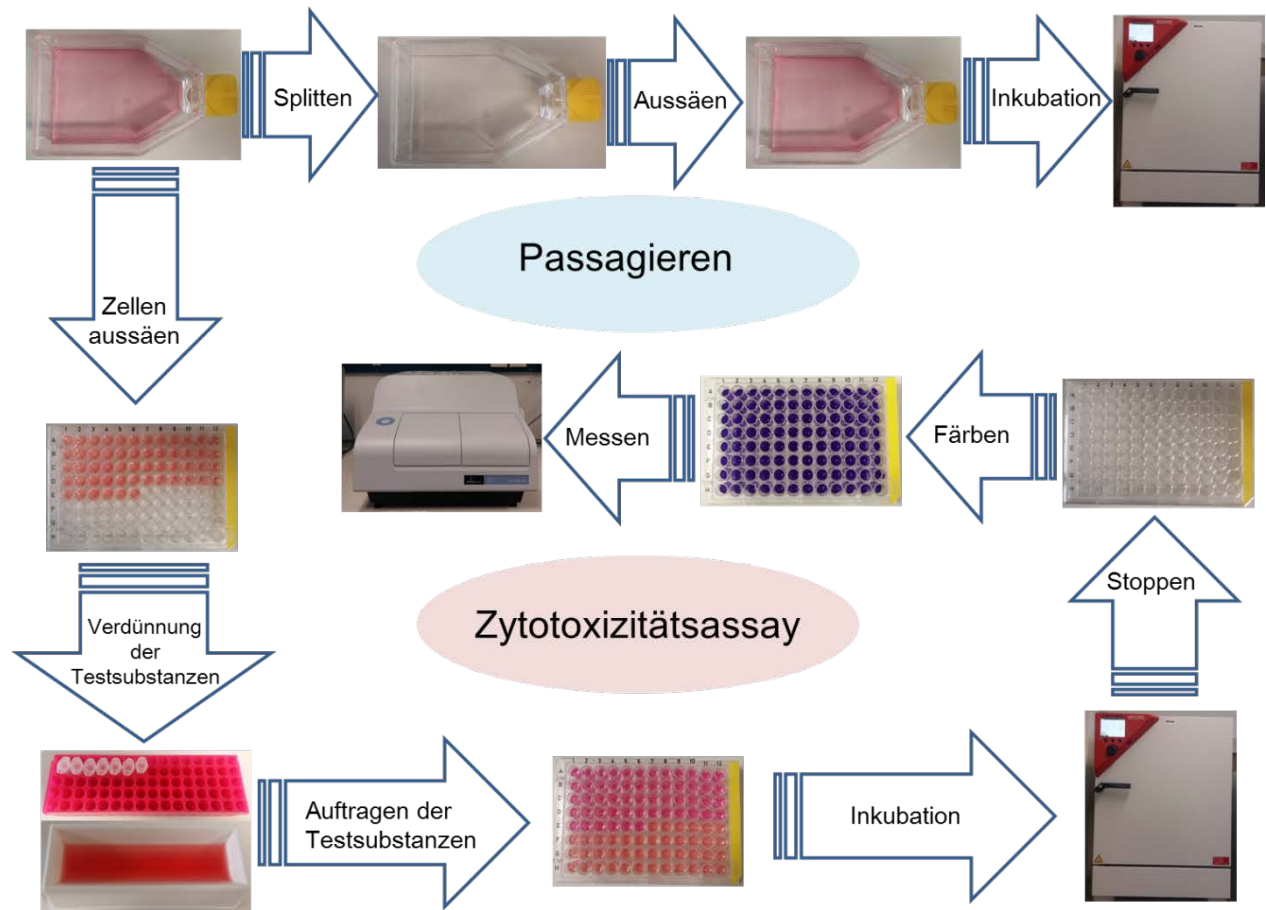
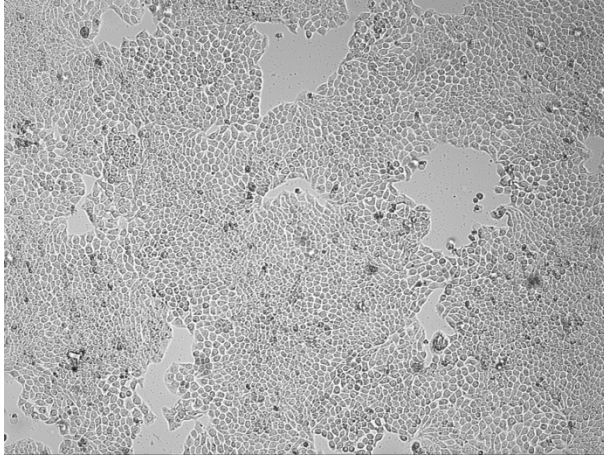


Abb. 78: Allgemeiner Zyklus in der Zellkultur mit dem wöchentlichen Passagieren der Zellen (oben) und Vorbereitung und Durchführung des Zytotoxizitätsassays (unten)

8.5.2 Verwendete Zelllinien in der Zellkultur

HT-29



Humane kolorektale Adenokarzinomzellen

Ethnizität: Kaukasier

Alter: 44 Jahre

Geschlecht: weiblich

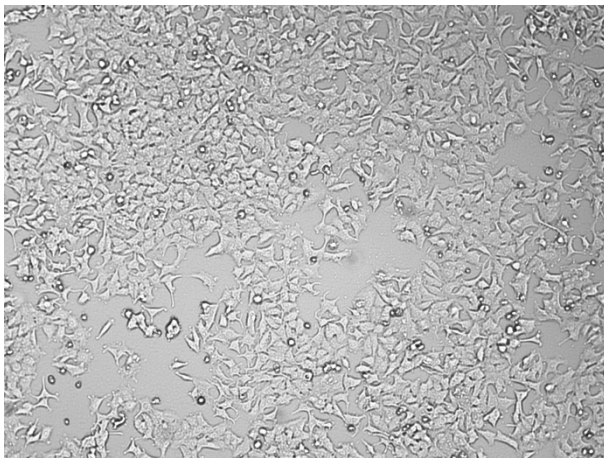
Morphologie: epitheliales Gewebe

Wachstum: adhärenente Monolayer

Bezug: CLS Cell Lines Service GmbH

Abb. 79: HT-29 Zellen (10-fache Vergrößerung mit EVOS xl von AMG)

MCF-7



Humane Brustadenokarzinomzellen

Ethnizität: Kaukasier

Alter: 69 Jahre

Geschlecht: weiblich

Morphologie: Epithel ähnliches Gewebe

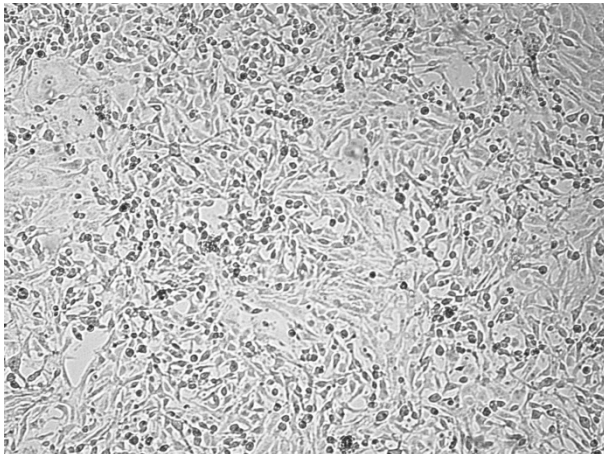
Wachstum: adhärenente Monolayer

Modulation: östrogenabhängig

Bezug: CLS Cell Lines Service GmbH

Abb. 80: MCF-7 Zellen (10-fache Vergrößerung mit EVOS xl von AMG)

MDA-MB-231



Humane Brustadenokarzinomzellen

Ethnizität: Kaukasier

Alter: 51 Jahre

Geschlecht: weiblich

Morphologie: epitheliales Gewebe

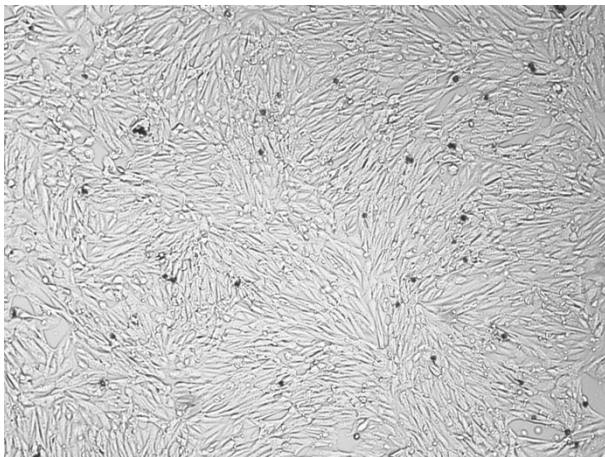
Wachstumseigenschaften: adhärenente Monolayer

Modulation: nicht hormonabhängig

Bezug: CLS Cell Lines Service GmbH

Abb. 81: MDA-MB-231 Zellen (10-fache Vergrößerung mit EVOS xl von AMG)

RC-124



Humane primäre Nierenzellen

Ethnizität: Kaukasier

Alter: 63 Jahre

Geschlecht: männlich

Morphologie: epitheliales Gewebe

Wachstumseigenschaften: adhärenente Monolayer

Bezug: CLS Cell Lines Service GmbH

Abb. 82: RC-124 Zellen (10-fache Vergrößerung mit EVOS xl von AMG)

8.6 Kristallviolettassay zur Bestimmung der Zytotoxizität

Die Methode für die Bestimmung der antiproliferativen Eigenschaften wurde von Ott et al. [308] übernommen und modifiziert. Der Ablauf ist dem folgenden Schema (Abb. 84) zu entnehmen:

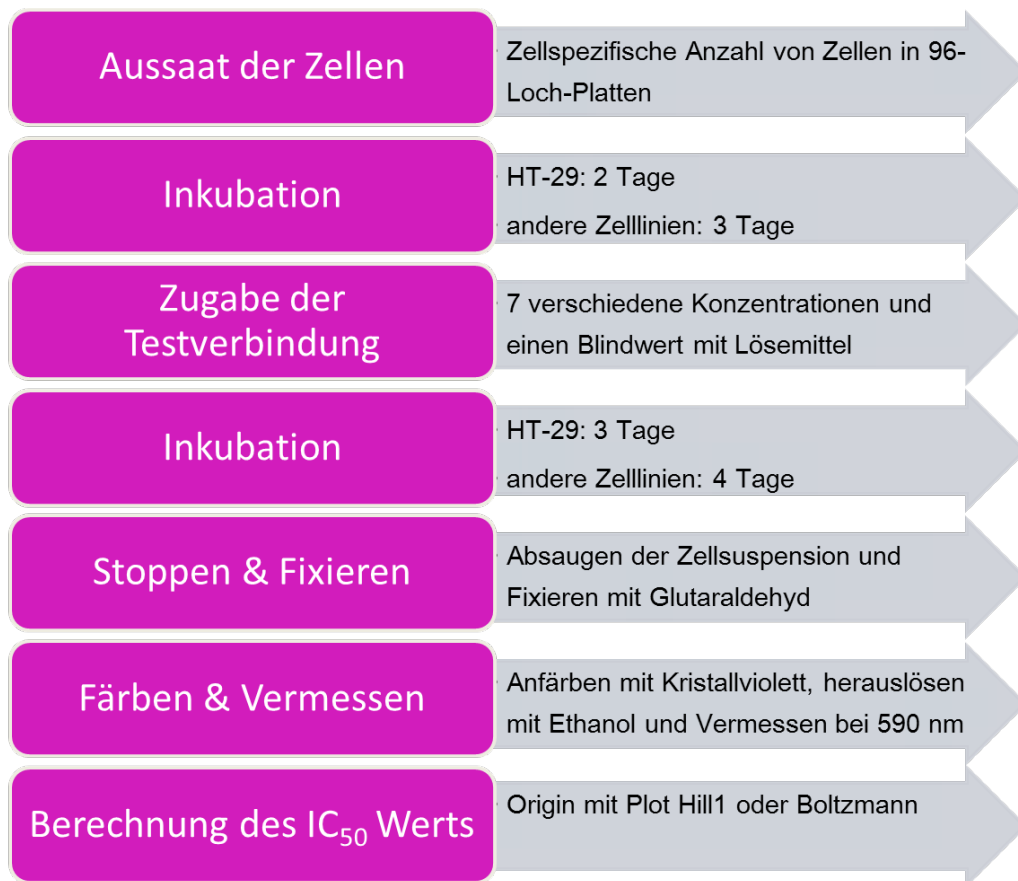


Abb. 83: Zusammenfassung des Zytotoxizitätstests

Die Einstellung der Zellzahl in den jeweiligen Suspensionen wird mit Hilfe der Neubauer (improved) Zählkammer durchgeführt. Ein Volumen von 100 µL der entsprechenden verdünnten Zellsuspension wird in 96-Loch-Mikrotiterplatten pipettiert: HT-29 Zellen (2565 Zellen/mL), MDA-MB-231 Zellen (4120 Zellen/mL), MCF-7 Zellen (4840 Zellen/mL) und RC-124 Zellen (1460 Zellen/mL) (Anmerkung: für RC-124 wurden Gelatine-beschichtete Platten verwendet) und bei 37 °C / 5 % CO₂ für 72 Stunden (MCF-7, MDA-MB-231, RC-124) oder 48

Stunden (HT-29) inkubiert. Die abweichende Wachstums- und Inkubationszeit der HT-29 Kolonkarzinomzellen resultiert aus ihrer höheren Teilungsrate und dem damit einhergehenden schnelleren Wachstum.

Für die Versuche mit den RC-124 Zellen werden die 96-Loch-Mikrotiterplatten wie folgt modifiziert: 30 μL einer sterilen 1,5 %igen Gelatinelösung werden in jedes Well pipettiert, mit dem Deckel verschlossen und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Überschuss an Gelatine wird danach abgesaugt und die Beschichtung einmal mit 30 μL PBS je Well gewaschen.

Zur Bestimmung des Status Quo wird pro Zelllinie eine t_0 -Platte extra vorbereitet und zu Beginn der Testung gestoppt. Der Mittelwert dieser 96-fachen Bestimmung wird in die spätere Berechnung mit einbezogen.

	Wells 1 – 6	Wells 7 – 12
A	Kontrolle	Substanz 1 – 0,2 μM
B	Substanz 1 - 1 μM	Substanz 1 - 4 μM
C	Substanz 1 - 10 μM	Substanz 1 - 20 μM
D	Substanz 1 - 50 μM	Substanz 1 - 100 μM
E	Kontrolle	Substanz 2 – 0,2 μM
F	Substanz 2 - 1 μM	Substanz 2 - 4 μM
G	Substanz 2 - 10 μM	Substanz 2 - 20 μM
H	Substanz 2 - 50 μM	Substanz 2 - 100 μM

Tab. 23: Pipettierschema einer 96-Lochplatte für den Zytotoxizitätsassay

Aus frisch hergestellten Stammlösungen der verschiedenen Testsubstanzen in DMF, DMSO oder destillierten Wasser werden Verdünnungsreihen der gewünschten Konzentrationen mit Zellkulturmedium hergestellt. Diese Konzentrationen entsprechen jeweils den 1000-fachen Testkonzentrationen. Direkt vor dem Auftragen auf die Zellen werden 10 μL der

Testsubstanzlösung mit 10 mL Medium gemischt (die Endkonzentration des Lösemittels beträgt 0,1 % v/v). Das alte Medium wird abgesaugt und gegen 200 µL des neuen Mediums ausgetauscht. Beispielverdünnungen können im folgenden Pipettierschema entnommen werden (siehe Tab. 23). Es werden immer 6-fache Parallelbestimmungen durchgeführt.

Nach 72 Stunden (HT-29) oder 96 Stunden (MCF-7, MDA-MB-231, RC-124) wird die verbleibende Biomasse der Zellen über die Kristallviolett-Färbemethode bestimmt.

Das Zellkulturmedium mit den Testsubstanzen wird abgesaugt und zur Fixierung der noch lebenden Zellen mit 100 µL Glutaraldehydlösung überschichtet. Das Glutaraldehyd bildet im neutralen wässrigen Medium unterschiedlich lange Polymere, welche in einer nukleophilen Substitutionsreaktion unter der Abscheidung von Wasser mit den Aminogruppen der Membranproteine zu Iminen kondensieren. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten wird die Fixierlösung abgeklopft und die Zellen mit 180 µL PBS vor dem Austrocknen geschützt. Die Platten können so bis zur weiteren Behandlung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert werden.

Zur Färbung der noch vorhandenen Biomasse wird der Puffer durch Ausklopfen entfernt und mit 100 µL Kristallviolettlösung (0,02 %) versetzt. Nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten wird die Farbstofflösung ausgeschüttet, die gefärbten Zellen zweimal mit Wasser gewaschen und 15 Minuten mit sauberem Wasser überschichtet stehengelassen. Anschließend wird das Wasser entfernt, 180 µL Ethanol (70 %) hinzugegeben und die Platten 2 – 4 Stunden unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Ethanol löst das in das Chromatin eingelagerte Kristallviolett aus den Zellen heraus. Die violette Lösung wird dann bei 590 nm im Mikroplattenreader vermessen. Die Absorption ist proportional zur verbleibenden Zellmasse. Somit kann durch die Inkubation verschiedener Testverbindungskonzentrationen eine sigmoidale Kurve erstellt werden, in der ausgehend von 100 % der Zellmasse (Kontrolle) die Abnahme mit der Konzentrationssteigerung aufgetragen wird. Der IC_{50} Wert berechnet sich folglich als die Konzentration, bei der die Biomasse um 50 % reduziert wurde. Die Mittelwerte

und Standardabweichungen ergeben sich aus mindestens drei voneinander unabhängigen Versuchen.

$$T/C_{\text{kor}} [\%] = 100 * (B - t_0) / (K - t_0)$$

$T/C_{\text{kor}} [\%]$ = Biomasse im Vergleich zur Kontrolle in Prozent

t_0 = Mittelwert der 96 Wells der t_0 -Platte (Absorption sollte zwischen 0,2 und 0,4 liegen) \pm 0 %

K = Mittelwert der 6-12 Wells der Kontrolle (Absorption sollte zwischen 1,0 und 2,4 liegen) \pm 100 %

B = Mittelwert der 6 Wells der entsprechenden Testkonzentration

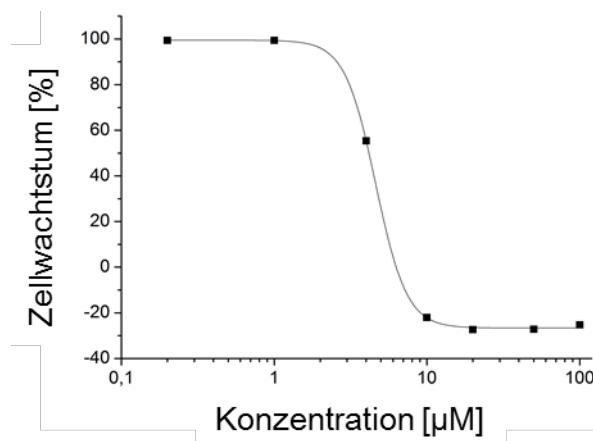


Abb. 84: Grafische Auswertung des Zytotoxizitätsassay

Die Ergebnisse werden folgendermaßen gedeutet:

> 100 % – inaktiv/ keine Wirkung

0 – 100 % antiproliferative/zytostatische Wirkung

> 0 % zytotoxische Wirkung

8.7 Zellaufnahme in MCF-7 Zellen

Die Zellaufnahmestudien wurden nach einer Methode nach Ott et al. [308] mit kleineren Modifikationen durchgeführt. Ein Übersichtsschema ist in Abb. 87 zu sehen.

8.7.1 Inkubation

In einer 150 cm² Zellkulturflasche werden MCF-7 Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 80 % inkubiert. Das Medium wird abgesaugt und gegen 20 mL Medium ausgetauscht, welches

20 µL einer Stammlösung enthält, die in diesem Schritt 1000-fach verdünnt wird. Die Flaschen werden bis zu den gewünschten Zeitpunkten im Brutschrank inkubiert. Danach wird das Medium entfernt, die Zellen mit 20 mL PBS Puffer gespült, mit einem Zellschaber in 20 mL neuen PBS suspendiert und vom Flaschenboden abgelöst. Die homogenisierte Zellsuspension wird in 15 mL Reaktionsgefäße überführt und 15 Minuten bei 3500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und das Zellpellet bis zur weiteren Vermessung im Gefrierschrank bei -4 °C gelagert.

8.7.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der einzelnen Pellets wurde mit der Bradford Methode durchgeführt. [309] Das Zellpellet wird in destillierten Wasser resuspendiert (max. 1,0 mL) und im Ultraschallbad bei 30 °C über 30 Minuten lysiert. Die einzelnen Probesuspensionen werden für die Vermessung mit einem Endvolumen von 50 µL verdünnt (1:10- bzw. 1:20-Verdünnung).

Für die Kalibrierung wird eine BSA (Kälbeserumalbumin) Stammlösung mit einer Konzentration von 1,0 mg Protein/mL hergestellt und wie in Tab. 24 verdünnt:

Proteinlösung [µL]	destilliertes Wasser [µL]
0	100
6	94
12	88
24	76
36	64
48	52
60	40
72	28

Tab. 24: Verdünnungsreihe von BSA (1 mg/mL) für die Kalibrierung

Jeweils 20 µL der verdünnten Probelösungen und die acht Kalibrierlösungen (wie in Tab. 24 aufgeführt) werden jeweils zweifach auf eine 96-Lochplatte aufgetragen, 200 µL Bradford Reagenz dazugegeben und gut durchmischt (Abb. 86).

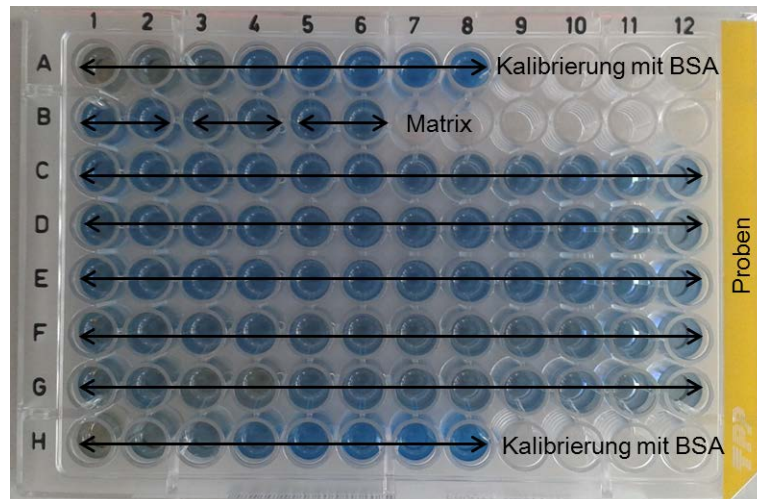


Abb. 85: Beispielplatte nach der Inkubation von verdünnten Zellsuspensionen mit Bradford Reagenz

Nach einer Inkubation über 30 Minuten unter leichtem Schütteln (Raumtemperatur) wird der blau- gefärbte Protein-Farbstoff-Komplex im Mikroplattenreader bei 595 nm vermessen. Die Proteingehälter der Matrix und Proben werden in mg/mL berechnet, wobei die Kalibriergerade ein Bestimmtheitsmaß von mindestens 0,990 aufweisen soll.

8.7.3 Bestimmung des Gold- bzw. Halogengehalts mittels AAS/MAS

Für die Quantifizierung des Metall- und Halogengehalts in den Zellsuspensionen werden alle Proben auf eine festgelegte Konzentration zwischen 0,5 mg Protein/mL und 1,5 mg Protein/mL eingestellt. Die Proben werden wie in Kapitel 8.10.1 und Kapitel 8.10.2. beschriebenen vermessen.

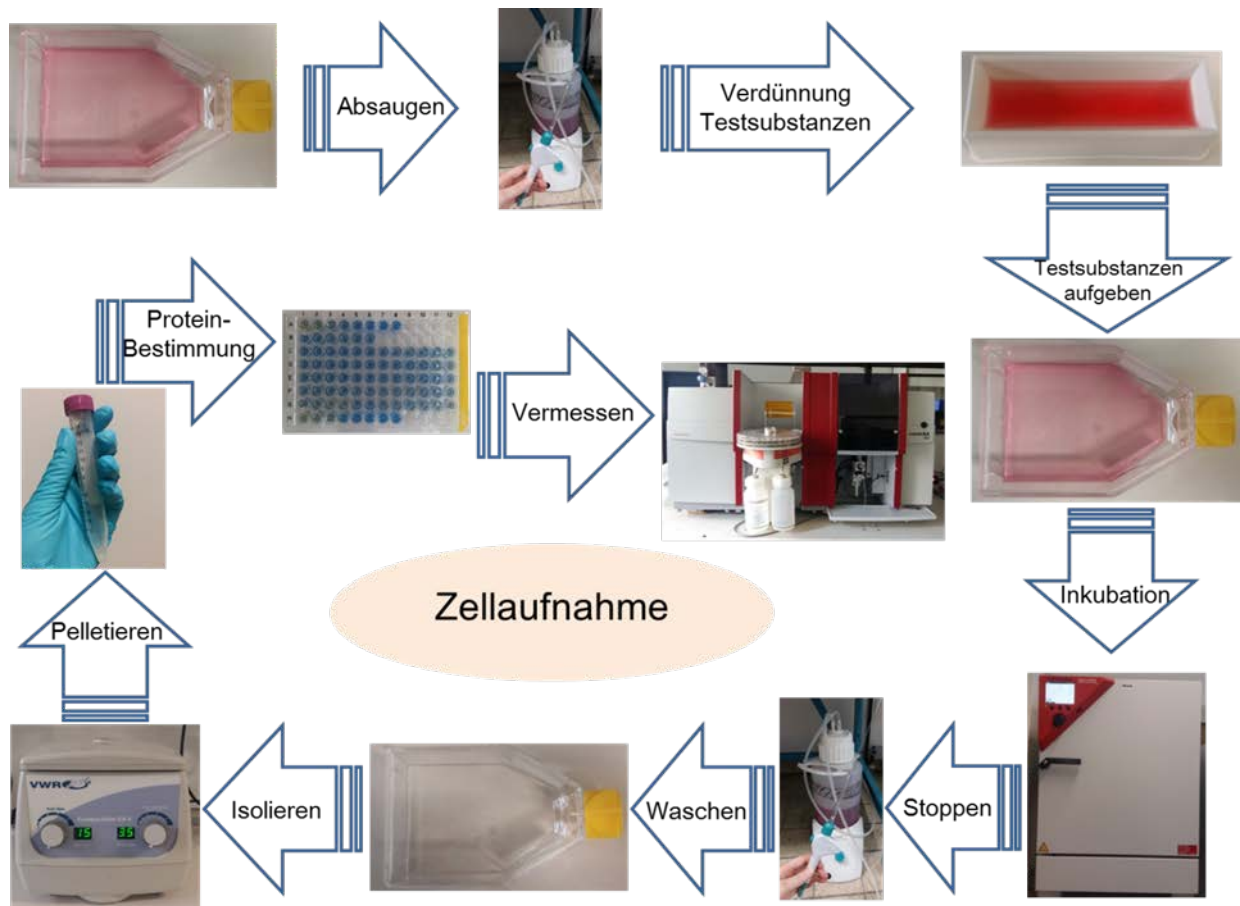


Abb. 86: Ablaufschema der Zellaufnahmestudien in MCF-7 Brustkrebszellen

8.8 Proteinbindung an Serumalbumin und Proteine des fetalen Kälberserums

8.8.1 Durchführung

Der Ethanolpräzipitationstest wurde nach Ma et al. [309] mit isolierten Serumalbumin vom Rind (BSA) und in modifizierter Form mit fetalen Kälberserum (FCS) durchgeführt (Abb. 88).

Hierzu werden in 11 mL DMEM Zellkulturmedium entweder 440 mg BSA (Endkonzentration: 40 mg/mL) gelöst oder 1,1 mL FCS (Endkonzentration: 10 %) supplementiert. Jeweils 1 mL jeder Matrixlösung wird als Blindwert entnommen und weiterführend wie die Proben behandelt. Es werden Probelösungen der Substanzen in DMF oder DMSO mit der 1000-fachen Testkonzentration hergestellt. 10 µL dieser Lösungen werden dann zu den verbleibenden 10 mL Zellkultur-Proteinlösungen pipettiert und gut durchmischt. Der Reaktionsansatz wird dann in einem Brutschrank bei 37 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Zu den gewünschten Zeitpunkten (hier: 0, 1, 4, 8, 24 und 48 Stunden) wird eine Probe von 250 µL gezogen und sofort mit 500 µL eisgekühlten absoluten Ethanol (-25 °C) versetzt und dadurch die enthaltenen Proteine ausgefällt. Nach zwei Stunden im Tiefkühlschrank muss die Probe bei 2200 U/min und 4 °C für 6 Minuten - 12 Minuten zentrifugiert werden. Vom Überstand werden 400 µL entnommen und im Tiefkühlschrank (-25 °C) für die weiteren Vermessungen aufbewahrt. Für die Kalibrierung wird eine Matrixlösung ohne Substanz hergestellt und genauso behandelt wie die Proben vorher. Es wird mindestens eine Wiederholung durchgeführt.

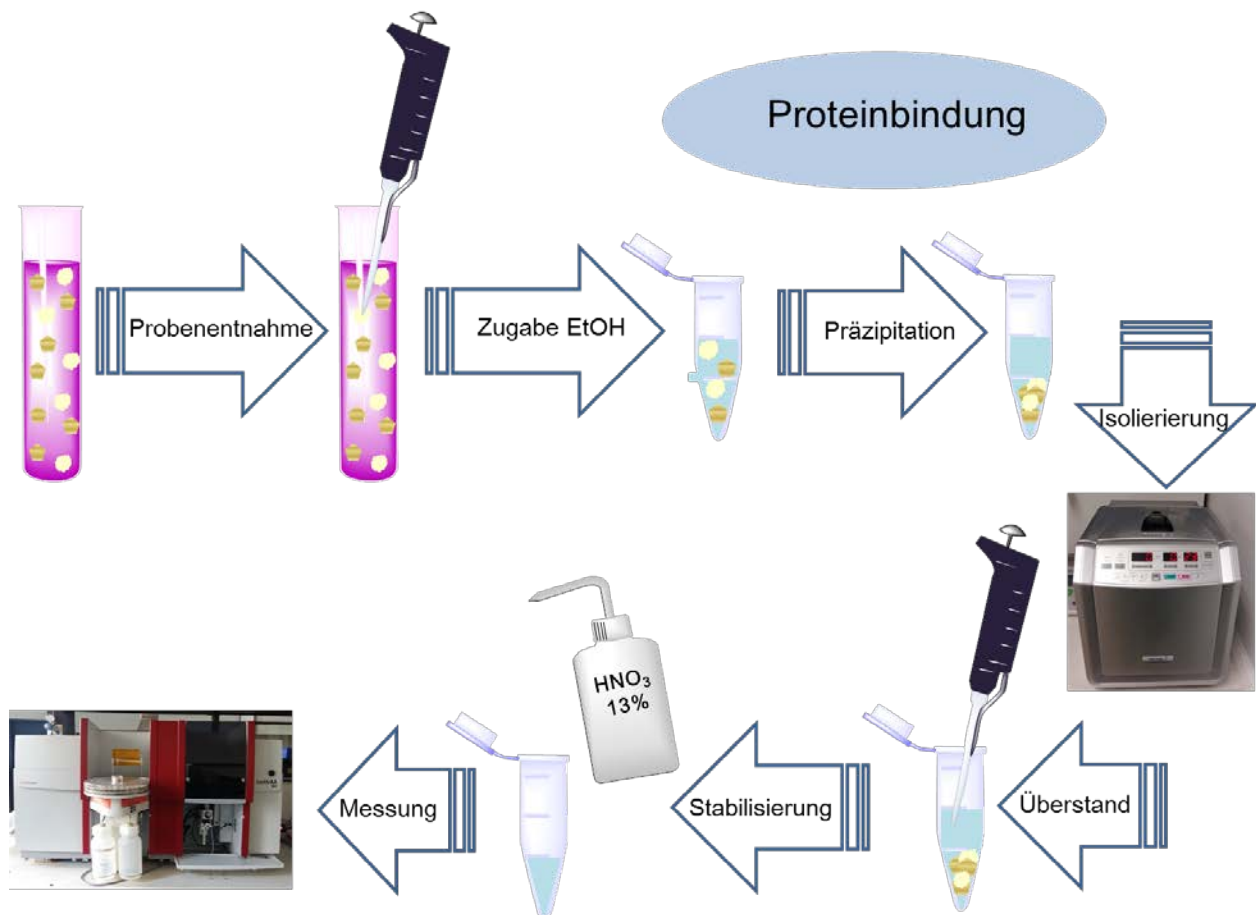


Abb. 87: Übersichtsschema des Proteinbindungsassays von Goldkomplexen an Serumproteine

8.8.2 Messung

100 μL Probelösung wird zur Stabilisierung mit 10 μL Salpetersäure (13 %) versetzt, weiterfolgend nach einer modifizierten Methode wie in Kapitel 8.10.1 behandelt und sofort vermessen. Die Quantifizierung der Goldgehalts mit der HR-CS AAS werden mindestens Zweifachbestimmungen durchgeführt.

8.8.3 Berechnung

Bei diesem Test wird der ungebundene Anteil bestimmt und dadurch auf den gebundenen Anteil zurückgeschlossen. Der gebundene Anteil errechnet sich mit folgender Formel:

$$M_{\text{gebunden}} [\%] = 100 / c(M)_{\text{Inkubation}} * [c(M)_{\text{Inkubation}} - c(M)_{\text{ungebunden}} * 3]$$

M = entsprechendes Metall

c = Konzentration in μM

$M_{\text{Inkubation}}$ = Ausgangskonzentration des Metalls

$M_{\text{ungebunden}}$ = Metallkonzentration des Überstands

8.9 Bestimmung des Octanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten (log P)

Die Stammlösungen der Testverbindungen werden mit einer Konzentration von 20 mM hergestellt. In einen Rundkolben, welcher 5 mL destilliertes Wasser und 5 mL Octanol enthält, werden 10 μL dieser Stammlösung hinzugegeben und unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur über eine Stunde stengelassen. Anschließend werden die beiden Lösemittelphasen mit einem Schütteltrichter fraktioniert und aus jeder Phase eine Probe mit einem Volumen von 400 μL entnommen. Der Gehalt an Gold in jeder Phase wird mit der HR-CS ASS (siehe Kapitel 8.10.1.) bestimmt und der log P Wert mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Log P} = \log [\text{Gold}_{\text{Octanol}}] / [\text{Gold}_{\text{Wasser}}]$$

8.10 Quantifizierung mit HR-CS AAS/MAS

Für die Quantifizierung des Gold- sowie des Fluorgehalts wurde ein contrAA 700 Hochauflösungskontinuumsstrahleratomabsorptionsspektrometer (HR-CS AAS) von Analytik Jena AG verwendet. Die Kalibrierung wurde über einen Matrixabgleich durchgeführt, wobei alle Proben und Kalibrierlösungen eine genau eingestellte Proteinmenge enthalten (0,25 mg Protein/mL bis 1,0 mg Protein/mL). Für die Kalibrierung werden Stammlösungen der

entsprechenden Substanzen in DMF bzw. DMSO hergestellt und mit der Matrixlösung zu den gewünschten Konzentrationen verdünnt.

Für die Messungen wird der Mittelwert aus drei Einzelinjektionen derselben Probe berechnet. Der Gehalt von Gold bzw. Fluor wird als nmol Analyt pro mg Zellprotein oder als zelluläre molare Konzentration [μM] angegeben. Die Methode zur Berechnung der zellulären molaren Konzentration der MCF-7 Zellen wurde aus der Literatur übernommen. [308]

8.10.1 Gold

Für die Detektion des Metalls wird bei der Probenvorbereitung zu jeder 100 μL Probelösung jeweils 10 μL Triton-X 100 (1 %) und 10 μL Ascorbinsäure (1 %) hinzugefügt. Davon werden 25 μL pro Messung in ein beschichtetes Standard Grafitrohr (Analytik Jena) injiziert und, wie im Temperaturprogramm (Tab. 25) aufgeführt, thermisch behandelt.

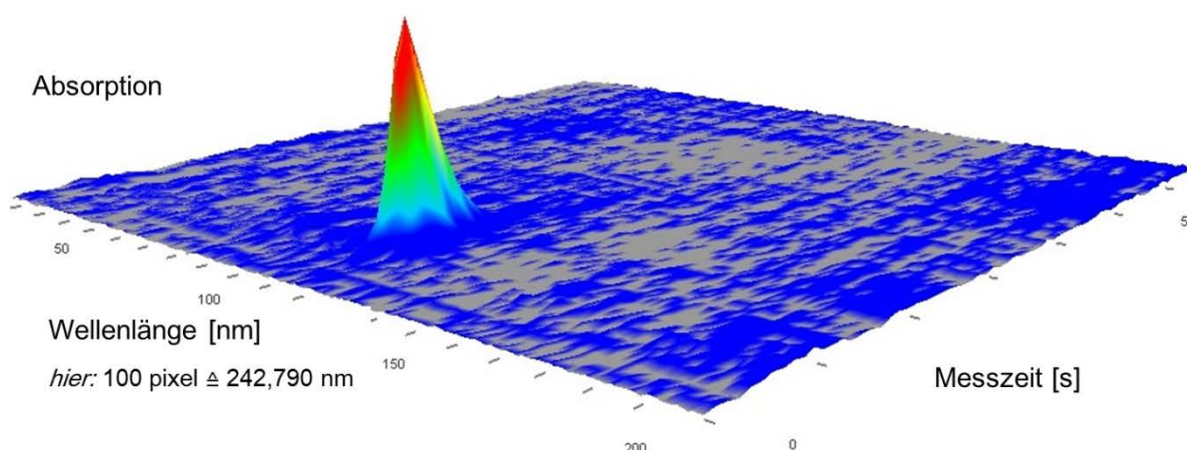


Abb. 88: HR-CS AAS Spektrum von Aurafin (2 μM Ausgangskonzentration)

Das Temperaturofenprogramm wurde in großen Teilen von Ott et al. [308] übernommen und modifiziert. Die Trocknungsschritte des Ofenprogramms wurden angepasst, sodass ein Verspritzen der Matrixlösung während der Trocknungsphase verhindert werden konnte. Die Ausheizphase wurde leicht verlängert, um eine komplette Entfernung der vermessenen

Probenrückstände zu gewährleisten. Der Goldgehalt wurde bei einer Wellenlänge von 242,795 nm bestimmt (Abb. 89).

Schritte	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Haltezeit [s]	Gasspülung
Trocknen	80	8	20	Max
Trocknen	90	3	20	Max
Trocknen	110	5	10	Max
Trocknen	350	50	15	Max
Pyrolyse	700	200	20	Max
Gasanpassung	700	0	5	Stop
Atomisierung	1850	1500	6	Stop
Ausheizen	2550	500	6	Max

Tab. 25: Modifiziertes Temperaturprogramm zur Quantifizierung des Goldgehalts mittels Grafitrohrtechnik

8.10.2 Fluor

Für die Bestimmung des organisch gebundenen Fluors wurde eine bereits etablierte Methode von Würtenberger et al. [271] übernommen und modifiziert. Das Standardgrafikrohr (Analytik Jena AG, Germany) wird, wie bereits in der Literatur beschrieben, mit einer 0,05 mm dicken Tantalfolie (Sigma Aldrich, Germany) ausgekleidet und entsprechend thermisch vorbehandelt.

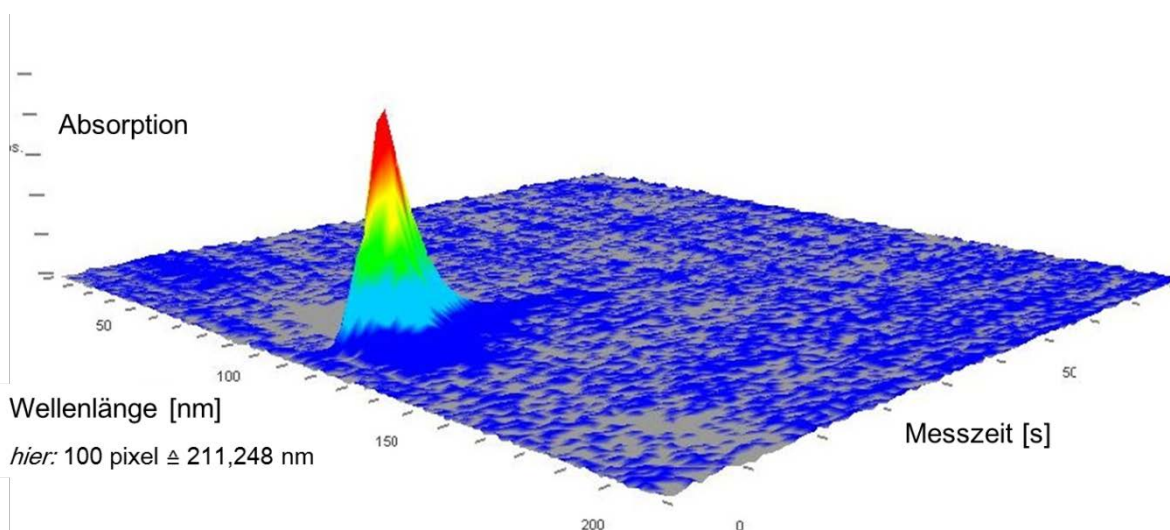


Abb. 89: HR-CS AAS Spektrum von organisch gebundenen Fluor als Galliummonofluorid (2 μ M Ausgangskonzentration)

Das Temperaturprogramm (Tab. 26) wurde in den Trocknungsschritten dem Probenvolumen und der Matrix angepasst, sodass ein Blasenwerfen und Verspritzen der Probe bei der Erwärmung verhindert wird. Des Weiteren wurden auch die Kühl- und Ausheizphasen modifiziert. Die Konzentrationen des Molekülbildungsreagenz Galliumnitrat wurden leicht verändert (7,5 g/L und 10 g/L). Zu 100 µL Probelösung wurden direkt vor der Messung 10 µL Triton-X 100 (1 %) pipettiert. Das Injektionsvolumen der Einzelmessungen betrug 20 µL. Die Proben wurden wie in Tab. 22 aufgeführt thermisch behandelt. Dabei wurden die Galliumnitratlösungen an unterschiedlichen Zeitpunkten des Temperaturprogramms per Autosampler zu den Proben hinzugegeben. Das Fluor wird als Galliummonofluorid bei einer Wellenlänge von 211,248 nm bestimmt (Abb. 90).

Schritte	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Haltezeit [s]	Gas Spülung	Modifizier Ga(NO ₃) ₃
Trocknen	120	30	5	Max	2 µL 5,0 g/L
Kühlen	80	NP	1	Max	
Trocknen	90	6	45	Max	5 µL 7,5 g/L
Trocknen	120	6	20	Max	
Trocknen	300	20	3	Max	
Pyrolyse	520	200	10	Max	
Gasanpassung	520	0	5	Stop	
Vaporisierung	1200	800	7	Stop	
Ausheizen	2500	1000	4	Max	

Tab. 26: Modifiziertes Temperaturprogramm für die Quantifizierung des Fluorgehalts mittels Grafitrohrtechnik
NP = no Power

8.11 Photometrische Stabilitätsuntersuchungen

8.11.1 Gerätespezifikationen und Einstellungen

Die UV/VIS-Messungen wurden von einem Specord 40 Photometer von Analytik Jena und der Software Winspect durchgeführt. Der Messbereich wurde auf 200 – 600 nm eingegrenzt. Die Schrittweite der Messungen betrug 0,5 nm mit einer Geschwindigkeit von 5 nm/s.

8.11.2 Probenvorbereitung

Die entsprechenden Komplexe werden in DMF gelöst und mit DMEM Zellkulturmedium (ohne Phenolrot Farbindikator) auf 50 μ M verdünnt. 1 mL der Verdünnung wird sofort in eine Quarzküvette pipettiert und vermessen. Während des gesamten Versuchs werden die Proben bei 37 °C inkubiert. Ein Referenzspektrum von reinen DMF in Zellkulturmedium wurde vorweg aufgenommen und direkt mit der automatischen Funktion der Software von den Probenspektren abgezogen. Die Konzentration des DMF entsprach in der Referenz- als auch in den Probenlösungen 0,1 % v/v.

8.12 HPLC-MS Stabilitätsuntersuchungen

8.12.1 Gerätespezifikationen

Für die Stabilitätstests wurde eine HPLC Infinity 1260 von Agilent Technologies (1260 Quat Pump/ALS/Thermostat TCC/DAD VL) verwendet. Gekoppelt wurde das Gerät mit der Masse 6120 Quadrupole LC/MS mit austauschbarer ESI Quelle (Agilent Technologies). Die Detektion erfolgte parallel bei 240 nm (DAD) und bei einem Massenbereich von m/z 2 bis 1000 (Scan Mode, positiv, Fragmentor 100, Gain 1) des MSD.

8.12.2 Einstellungen

Das Injektionsvolumen der Probelösung betrug 2 µL, die Laufzeit der einzelnen Probenläufe belief sich auf 6 min mit einer eingestellten Fließgeschwindigkeit von 0,5 mL/min. Die Proben wurden permanent während des Experiments im beheizbaren Autosampler bei 37 °C inkubiert.

8.12.3 Probenvorbereitung und Durchführung

Alle Testsubstanzen werden mit DMF zu einer Konzentration von 100 mM gelöst und mit den entsprechenden Matrices 100-fach verdünnt. Nach der Filtration durch einen PTFE-Filter (Porendurchmesser: 0,2 µm) wurden die Proben in den Autosampler überführt und sofort vermessen. Es folgten weitere Messungen zu festgelegten Zeitpunkten (0 / 1,5 / 3 / 6 / 8 / 24 / 48 / 72 / 96 Stunden), wobei die Proben jeweils kurz vor der Injektion gut durchmischt wurden. Die Stabilitäten wurden in den Matrices: DMF, DMSO, n-Octanol, destillierten Wasser, PBS Puffer (pH 7,4), Zellkulturmedium DMEM ohne Supplemente (mit Phenolphthalein) bestimmt.

8.13 Thioredoxinreduktase (Säugetier) Enzyminhibitionstest

Zur Bestimmung der Enzyminhibition der Säugetier TrxR wurde ein bereits etablierter Enzyminhibitionstest durchgeführt. [310]

TrxR der Ratte (Sigma Aldrich) wurde käuflich erworbenen und zu einer Konzentration von 3,58 U/mL in destillierten Wasser verdünnt. Von allen Testverbindungen werden Stammlösungen in DMF oder Wasser, wenn nicht möglich in DMSO hergestellt.

25 µL der hergestellten Enzymlösung wird mit 25 µL der verschiedenen Testverbindungen (100-fach mit Kaliumphosphatpuffer verdünnt: 10 µL der Stammlösung und 990 µL Puffer) zusammengegeben.

Als Positivkontrolle wird die gleiche Menge an Lösemittel mit PBS verdünnt. Der Blindwert besteht aus 25 µL DMF (100-fach in Puffer verdünnt: 10 µL Lösemittel + 990 µL Puffer) und 25 µL reinen Puffer. Die Endkonzentration des Lösemittels beträgt 0,5 % v/v (Tab. 27).

	Enzym Lösung	Testsubstanz (TS) oder Blindwert (BW)	Phosphatpuffer
Positivkontrolle	25 µL	-	25 µL
Negativkontrolle	-	25 µL (TS)	25 µL
Testsubstanz	25 µL	25 µL (TS)	-
Blindwert (Lösemittel dil.)	-	25 µL (BW)	25 µL

Tab. 27: Pipettierschema der Enzyminhibitionstests der Säugetier-TrxR

Die Proben werden unter leichtem Schütteln über 75 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann werden 225 µL eines Reaktionsmix' (siehe Verwendete Reagenzien Kapitel 8.2) dazugegeben. Nach der Zugabe von 25 µL einer 20 mM ethanolischen DTNB Lösung startet sofort die Umsetzung von DTNB zu 5-TNB. Nach guter Durchmischung wird die Absorption bei 405 nm zehn Mal alle 35 Sekunden gemessen (Abb. 91).

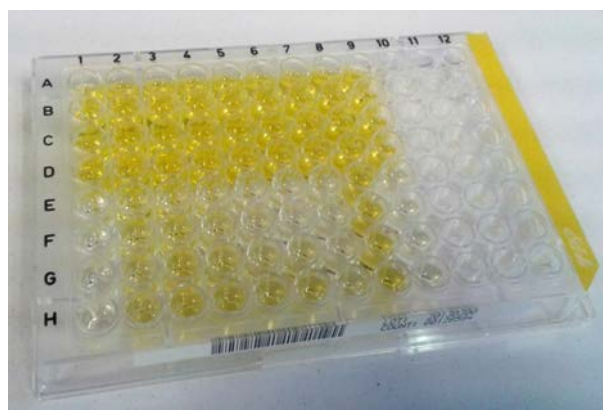


Abb. 90: Beispielplatte nach der Inkubation des Enzyms Thioredoxin Reduktase mit verschiedenen Konzentrationen einer Testsubstanz. Zu erkennen ist die unterschiedliche Intensität des gelben Farbstoffs, welche durch die Umsetzung des DTNB zu 5-TNB entsteht

8.14 Apoptoseinduktion in Nalm-6 Zellen: Zellzyklus-Analyse

Die Zellzyklus-Analyse wurde von Dr. Rainer Misgeld im Arbeitskreis von Dr. Dr. Aram Prokop am Institut der Experimentellen Onkologie im Kinderkrankenhaus Köln, Amsterdamer Straße 59, 50735 Köln, Deutschland durchgeführt.

Die Messungen der DNS Fragmentierung in Nalm-6 Zellen nach Einleitung des programmierten Zelltods wurden durch eine modifizierte Methode der Zellzyklus-Analyse (cell-cycle analysis) bestimmt, bei der die DNA Fragmentierung auf der Einzelzelebene detektiert wird. Für die Messungen der DNA Fragmentierung werden Nalm-6 Zellen (sowie auch Daunorubicin resistente Nalm-6 Zellen und Vincristin resistente Nalm-6 Zellen) mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/mL ausgesät und mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen behandelt. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden werden die Zellen durch Zentrifugieren (300 g für 5 Minuten) gesammelt, mit PBS bei 4 °C gewaschen und mit einer Mischung aus PBS/Formaldehyd (2 %, v/v) fixiert (Kühlung auf Eis, 30 Minuten). Danach werden die Zellen mit einem Gemisch EtOH/PBS (2:1, v/v) für 15 Minuten inkubiert, pelletiert und in PBS (enthält RNase A 40 mg/mL) resuspendiert. Nach einer weiteren Inkubation über 30 Minuten bei 37 °C werden die Zellen erneut pelletiert und schließlich in PBS (enthält Propidiumiodid 50 mg/mL) resuspendiert.

Die nukleare DNA Fragmentierung wird mit der Durchflusszytometrie (Flow Cytometric Determination) der hypodiploiden DNA quantifiziert. Die Daten werden mit dem FACScan System (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) analysiert, welches mit der Software CELLQuest ausgestattet ist. Die Ergebnisse werden in % Hypoploidie (subG1) angegeben, welche die Anzahl der apoptotischen Zellen widerspiegelt.

8.15 Bakterielle Wachstumshemmung: Mikrobouillon-Verdünnungstest

Der Mikrobouillon-Verdünnungstest wurde von Bianka Karge im Arbeitskreis von Dr. Mark Brönstrup am Institut für Chemische Biologie des Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung GmbH, Inhoffenstraße 7, 38124 Braunschweig, Deutschland durchgeführt.

Die verwendeten Stämme wurden bei 37 °C in folgenden Medien kultiviert: MH (21 g/L Müller-Hinton, 1 % Glucose, pH 7,4) oder TSY (30 g/L Casein-Sojabrühre, 3g/L Hefe Extrakt, pH 7,0 – 7,2). Alle verwendeten Bakterienstämme und ihre detaillierten Kultivierungsbedingungen können der Tab. 28 entnommen werden.

Die Bestimmung der minimalen inhibitorischen Konzentration (MIC) wurde nach einem standardisierten Protokoll in verschiedenen grampositiven, gramnegativen Bakterienstämmen als auch in dem Pilz *Candida albicans* durchgeführt (broth dilution test = Mikrobouillon-Verdünnungstest) [302].

Für die Beimpfung der 96-Lochplatten werden jeweils $2 - 8 \times 10^5$ koloniebildende Einheiten/mL (KBE/mL) in MH oder TSY Medium eingesetzt. Die Platten mit den verschiedenen Verdünnungsreihen der zu testenden Substanzen werden über 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen.

Die MIC Werte (in mg/mL und μ M) werden durch mindestens drei voneinander unabhängige Versuche bestimmt. Als Positivkontrollen werden die Antibiotika Ciprofloxacin (Cip), Amikacin (Ami) oder Linezolid (Lin) parallel getestet. Als Referenzsubstanz für die Goldkomplexe wurde zudem Auranofin verwendet.

Gramnegative Stämme	Positivkontrolle	Inkubationstemperaturen, Medium
<i>Acinetobacter baumannii</i> (DSM 30007, ATCC 19606)	Ciprofloxacin	37 °C, MH (21g/l Müller-Hinton, 1% Glucose, pH 7,4)
<i>Enterobacter cloacae</i> (DSM 26481, ATCC 23355)	Ciprofloxacin	37 °C, MH
<i>Escherichia coli</i> (DSM 1116, ATCC 9637)	Ciprofloxacin	37 °C, TSY
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (DSM 11678, ATCC 33495)	Ciprofloxacin	37 °C, MH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7 (DSM 24068)	Amikacin	37 °C, MH
Grampositive Stämme		
<i>Enterococcus faecium</i> (DSM 20477, ATCC 19434)	Ciprofloxacin	37 °C, TSY (30 g/L Casein-Soja-Brühe, 3 g/L Hefe Extrakt, pH 7,0 - 7,2)
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (DSM 11822, ICB 25701)	Linezolid	37 °C, TSY
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA (clinical isolate, RKI 11-02670)	Linezolid	37 °C, TSY

Tab. 28: Übersicht über die verwendeten Bakterienstämme und Medien

8.16 Thioredoxinreduktase (*E.coli*) Enzyminhibitionstest

Der neu entwickelte DTNB gekoppelte Thioredoxin Reduktase Inhibitionstest für *E.coli* wurde auf der Grundlage von Lu et al. [172] und Holmgren et al. [311] aufgesetzt und etabliert.

E.coli TrxR (Sigma Aldrich) und das natürliche Substrat *E.coli* Trx (Sigma Aldrich) wurden jeweils mit destilliertem Wasser zu einer Konzentration von jeweils 35,5 U/mL für das Enzym und 0,77 U/mL für das Substrat verdünnt. Für die Testverbindungen wurden Stammlösungen, vorzugsweise in DMF oder destillierten Wasser, sonst in DMSO, hergestellt. Die Stammlösung sollte immer 200-fach höher konzentriert sein als die höchste gewünschte Endkonzentration im Test. Die Verdünnungsreihen der Testverbindungen werden mit TE Puffer (siehe Verwendete Reagenzien Kapitel 8.2.) verdünnt (35 µl Stammlösung + 965 µl TE Puffer). Von jeder Konzentration wurden 20 µl in ein Well einer 96-

Loch Platte vorgelegt, sodass die Endkonzentrationen des Lösemittels 0,5 % V/V beträgt.

Für den Blindwert wird die gleiche Verdünnung des entsprechenden Lösemittels mit TE Puffer vorbereitet.

	NADPH Lösung	Enzym Lösung	Testsubstanz (TS) oder Blindwert (BW)	Substrat Lösung	TE Puffer
Positivkontrolle	100 µl	10 µl	20 µl (BW)	10 µl	-
Negativkontrolle	100 µl	-	20 µl (TS)	10 µl	10 µl
Testsubstanz	100 µl	10 µl	20 µl (TS)	10 µl	-
Blindwert (Lösemittel dil.)	100 µl	-	20 µl (BW)	-	20 µl

Tab. 29: Pipettierschema des Enzyminhibitionstests mit E.coli TrxR

Jeweils 10 µL der hergestellten Enzymlösung, 10 µL der Substratlösung und 100 µL NADPH (200 mM) werden zu den Testsubstanzen hinzu pipettiert und gut durchmischt (siehe Tab. 25). Für die Positivkontrolle wurde das Volumen der Testsubstanz gegen die Lösemittel/TE Puffer Verdünnung ausgetauscht. Die Blindwerte enthielten anstatt der Enzym- und Substratlösung 20 µL TE Puffer und 20 µl der Verdünnung des entsprechenden Lösemittels. Der Ansatz wurde über 75 Minuten bei 25 °C in einer 96-Loch Platte inkubiert (Tab. 29).

Nach der Inkubation wurden 100 µL eines Reaktionsmix (siehe Verwendete Reagenzien Kapitel 8.2) hinzugefügt. Die sofort einsetzende Reaktion wurde nach gutem Durchmischen im Mikroplattenreader bei 405 nm über ca. 6 Minuten vermessen (10-mal, alle 35 Sekunden) und die Bildung des gelben 5-TNB verfolgt. Der Blindwert wurde von allen Proben abgezogen und dadurch korrigiert. Der Anstieg der 5-TNB Konzentration folgte einem linearen Trend, wobei das Bestimmtheitsmaß mindestens ($r^2 \geq 0.990$) betragen soll.

Die enzymatische Aktivität wurde durch die Steigungen der Geraden der verschiedenen Testkonzentrationen berechnet (Anstieg in Absorption/s). Um bei jeder Testsubstanz sicher zu stellen, dass keine Reduktion des DTNB durch die Testverbindung katalysiert wird bzw.

die Testsubstanz nicht selbst im entsprechenden Wellenlängenbereich absorbiert, wurde jeweils zusätzlich eine Negativkontrolle mit vermessen. Hierfür wurde jeweils die höchste Konzentration jeder zu testenden Verbindung gewählt und die Enzymlösung durch eine entsprechende Menge an TE Puffer ersetzt. Die berechnete Gerade der Negativkontrolle darf keine Steigung aufzeigen.

Die IC_{50} Werte wurden als die Konzentration der Testsubstanzen berechnet, welche die Enzymaktivität im Vergleich zur Positivkontrolle um die Hälfte herabsetzt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt, der Mittelwert gebildet und die Standardabweichung berechnet.

9 Referenzen

- [1] World Health Organization (2016) Mortalitätsindikatoren nach 67 Todesursachen, Alter und Geschlecht. <http://www.euro.who.int/de/data-and-evidence/databases/mortality-indicator-database-mortality-indicators-by-67-causes-of-death,-age-and-sex-hfa-mdb>. Zuletzt abgerufen am 15.11.2016.
- [2] Statistisches Bundesamt Wiesbaden (2016) Todesursachen. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>. Zuletzt abgerufen am 15.11.2016.
- [3] DeSantis, C. E., Lin, C. C., Mariotto, A. B., Siegel, R. L., Stein, K. D., Kramer, J. L., Alteri, R., Robbins, A. S., Jemal, A. (2014) Cancer treatment and survivorship statistics, 2014. *A Cancer Journal for Clinicians* 64:252–271.
- [4] World Health Organization (2016) Data and statistics. <http://www.euro.who.int/en/health-topics/noncommunicable-diseases/cancer/data-and-statistics>. Zuletzt abgerufen am 15.11.2016.
- [5] Statistisches Bundesamt Wiesbaden (2014) Die 10 häufigsten Todesfälle durch Krebserkrankungen. <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabelle/Krebserkrankungen.html>. Zuletzt abgerufen am 15.11.2016.
- [6] Stewart, B. W. (2014) *World Cancer Report 2014*. IARC Press, Lyon.
- [7] Gottesman, M. M., Fojo, T., Bates, S. E. (2002) Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature reviews. Cancer* 2:48–58.
- [8] Alfarouk, K. O., Stock, C.-M., Taylor, S., Walsh, M., Muddathir, A. K., Verduzco, D., Bashir, A. H. H., Mohammed, O. Y., Elhassan, G. O., Harguindey, S., Reshkin, S. J., Ibrahim, M. E., Rauch, C. (2015) Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. *Cancer Cell International* 15(71):1-13.
- [9] Szakacs, G., Paterson, J. K., Ludwig, J. A., Booth-Genthe, C., Gottesman, M. M. (2006) Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature reviews. Drug discovery* 5:219–234.
- [10] Housman, G., Byler, S., Heerboth, S., Lapinska, K., Longacre, M., Snyder, N., Sarkar, S. (2014) Drug resistance in cancer: an overview. *Cancers* 6:1769–1792.
- [11] Eschenhagen, T., Force, T., Ewer, M. S., Keulenaer, G. W. de, Suter, T. M., Anker, S. D., Avkiran, M., Azambuja, E. de, Balligand, J.-L., Brutsaert, D. L., Condorelli, G., Hansen,

- A., Heymans, S., Hill, J. A., Hirsch, E., Hilfiker-Kleiner, D., Janssens, S., Jong, S. de, Neubauer, G., Pieske, B., Ponikowski, P., Pirmohamed, M., Rauchhaus, M., Sawyer, D., Sugden, P. H., Wojta, J., Zannad, F., Shah, A. M. (2011) Cardiovascular side effects of cancer therapies: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology. *European Journal of Heart Failure* 13:1–10.
- [12] Fleming, A. (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology* 10:226–236.
- [13] Fleming, A. (1945) Penicillin. Nobel Lecture.
https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/.../fleming-lecture.pdf. Zuletzt abgerufen am 15.11.2016.
- [14] World Health Organization (2014) Antimicrobial Resistance. Global Report on Surveillance. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/> Zuletzt abgerufen am 15.11.2016
- [15] Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K. M., Wertheim, H. F. L., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G. L., Gould, I. M., Goossens, H., Greko, C., So, A. D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A. Q., Qamar, F. N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z. A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G. D., Brown, E. D., Cars, O. (2013) Antibiotic resistance - the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases* 13:1057–1098.
- [16] Kummerer, K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment - a review - part I. *Chemosphere* 75:417–434.
- [17] Kummerer, K. (2009) Antibiotics in the aquatic environment - a review - part II. *Chemosphere* 75:435–441.
- [18] Levy, S. B., Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10:122–9.
- [19] Davies, J., Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology reviews* 74:417–433.
- [20] Milkman, R. (1990) Gene Transfer in the Environment. *Environmental Biotechnology. Science* 247:350–351.
- [21] Gaynor, D., Griffith, D. M. (2012) The prevalence of metal-based drugs as therapeutic or diagnostic agents: beyond platinum. *Dalton Transactions* 41:13239–13257.

- [22] Klasen, H. J. (2000) Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns* 26:117–130.
- [23] Alexander, J. W. (2009) History of the medical use of silver. *Surgical Infections* 10:289–292.
- [24] Klasen, H. (2000) A historical review of the use of silver in the treatment of burns. II. Renewed interest for silver. *Burns* 26:131–138.
- [25] Atiyeh, B. S., Costagliola, M., Hayek, S. N., Dibo, S. A. (2007) Effect of silver on burn wound infection control and healing: review of the literature. *Burns* 33:139–148.
- [26] Chernousova, S., Epple, M. (2013) Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie* 52:1636–1653.
- [27] Graham, D. Y., Fischbach, L. (2010) *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance. *Gut* 59:1143–1153.
- [28] Muller, N., Amiot, A., Le Thuaut, A., Bastuji-Garin, S., Deforges, L., Delchier, J.-C. (2016) Rescue therapy with bismuth-containing quadruple therapy in patients infected with metronidazole-resistant *Helicobacter pylori* strains. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology* 40:517–524.
- [29] Marshall, B. J., Warren, J. R. (1984) Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* 1:1311–1315.
- [30] Williams, K. J. (2009) The introduction of ‘chemotherapy’ using arsphenamine - the first magic bullet. *Journal of the Royal Society of Medicine* 102:343–348.
- [31] Abraham, J. J. (1948) Some Account of the History of the Treatment of Syphilis. *The British Journal of Venereal Diseases* 24:153–160.
- [32] Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S., Ilari, A. (2009) Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry* 52:2603–2612.
- [33] Dasari, S., Tchounwou, P. B. (2014) Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* 740:364–378.
- [34] Steinhilber, D., Schubert-Zsilavecz, M., Roth, H. J. (2010) *Medizinische Chemie*. 2. Auflage im Deutschen Apotheker-Verlag, Stuttgart.
- [35] Allardyce, C. S., Dyson, P. J. (2016) Metal-based drugs that break the rules. *Dalton transactions* 45:3201–3209.
- [36] Bergamo, A., Sava, G. (2015) Linking the future of anticancer metal-complexes to the therapy of tumour metastases. *Chemical Society Reviews* 44:8818–8835.

- [37] Ding, S., Bierbach, U. (2015) Target-selective delivery and activation of platinum-based anticancer agents. *Future Medicinal Chemistry* 7:911–927.
- [38] Leijen, S., Burgers, S. A., Baas, P., Pluim, D., Tibben, M., van Werkhoven, E., Alessio, E., Sava, G., Beijnen, J. H., Schellens, J. H. M. (2015) Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy. *Investigational New Drugs* 33:201–214.
- [39] Collery, P., Keppler, B., Madoulet, C., Desoize, B. (2002) Gallium in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 42:283–296.
- [40] Hofheinz, R. D., Dittrich, C., Jakupec, M. A., Drescher, A., Jaehde, U., Gneist, M., Graf von Keyserlingk, N., Keppler, B. K., Hochhaus, A. (2005) Early results from a phase I study on orally administered tris(8-quinolinolato)gallium(III) (FFC11, KP46) in patients with solid tumors—a CESAR study. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics* 43:590–591.
- [41] Ramsay, E. E., Dilda, P. J. (2014) Glutathione S-conjugates as prodrugs to target drug-resistant tumors. *Frontiers in Pharmacology* 5(181):1-16.
- [42] Schilling, T., Keppler, K. B., Heim, M. E., Niebch, G., Dietzfelbinger, H., Rastetter, J., Hanauske, A.-R. (1995) Clinical phase I and pharmacokinetic trial of the new titanium complex budotitane. *Investigational New Drugs* 13:327–332.
- [43] Kröger, N., Kleeberg, U. R., Mross, K., Edler, L., Hossfeld, D. K. (2000) Phase II Clinical Trial of Titanocene Dichloride in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Oncology Research and Treatment* 23:60–62.
- [44] Bugaj, A. M. (2016) Vascular targeted photochemotherapy using padoporfin and padeliporfin as a method of the focal treatment of localised prostate cancer - clinician's insight. *World Journal of Methodology* 6:65–76.
- [45] Taneja, S. S., Bennett, J., Coleman, J., Grubb, R., Andriole, G., Reiter, R. E., Marks, L., Azzouzi, A.-R., Emberton, M. (2016) Final Results of a Phase I/II Multicenter Trial of WST11 Vascular Targeted Photodynamic Therapy for Hemi-Ablation of the Prostate in Men with Unilateral Low Risk Prostate Cancer Performed in the United States. *The Journal of Urology*. 196(4):1096-1104.
- [46] Rubbiani, R., Wahrig, B., Ott, I. (2014) Historical and biochemical aspects of a seventeenth century gold-based aurum vitae recipe. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 19:961–965.
- [47] Sannella, A. R., Casini, A., Gabbiani, C., Messori, L., Bilia, A. R., Vincieri, F. F., Majori, G., Severini, C. (2008) New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established

antiarthritic metallodrug, exhibits potent antimalarial effects in vitro: Mechanistic and Pharmacological Implications. *FEBS letters* 582:844–847.

- [48] Yanagawa, A., Narikawa, S., Kudo, T., Shimada, J., Mizushima, Y., Endo, T., Kusakari, K. (1995) Anti-bacterial and anti-fungal effect of several anti-rheumatic drugs. *Ensho* 15:261–264.
- [49] Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M. F. N., Sobreira, T. J. P., Hedrick, V. E., Paul, L. N., Seleem, M. N. (2016) Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Scientific Reports* 6(22571):1–13.
- [50] Jackson-Rosario, S., Cowart, D., Myers, A., Tarrien, R., Levine, R. L., Scott, R. A., Self, W. T. (2009) Auranofin disrupts selenium metabolism in *Clostridium difficile* by forming a stable Au-Se adduct. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 14:507–519.
- [51] Simon, T. M., Kunishima, D. H., Vibert, G. J., Lorber, A. (1979) Cellular antiproliferative action exerted by auranofin. *The Journal of Rheumatology* 5:91–97.
- [52] Glennås, A., Rugstad, H. E. (1985) Ploidity and cell cycle progression during treatment with gold chloride, auranofin and sodium aurothiomalate. *Virchows Archiv B Cell Pathology Including Molecular Pathology* 49:385–393.
- [53] Reginster, J.-Y., Hilgsmann, M., Bruyere, O. (2010) Strontium Ranelate: Long-Term Efficacy against Vertebral, Nonvertebral and Hip Fractures in Patients with Postmenopausal Osteoporosis. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 2:133–143.
- [54] Blocka, K. (1983) Auranofin versus injectable gold. *The American Journal of Medicine* 75:114–122.
- [55] Shaw, C. F. (1999) Gold-Based Therapeutic Agents. *Chemical Reviews* 99:2589–2600.
- [56] Snyder, R. M., Mirabelli, C. K., Crooke, S. T. (1987) The cellular pharmacology of auranofin. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 17:71–80.
- [57] Tepperman, K., Finer, R., Donovan, S., Elder, R. C., Doi, J., Ratliff, D., Ng, K. (1984) Intestinal uptake and metabolism of auranofin, a new oral gold-based antiarthritis drug. *Science* 225:430–432.
- [58] Finkelstein, A. E., Walz, D. T., Batista, V., Mizraji, M., Roisman, F., Misher, A. (1976) Auranofin. New oral gold compound for treatment of rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 35:251–257.

- [59] Roder, C., Thomson, M. J. (2015) Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age. *Drugs in R&D* 15:13–20.
- [60] Schmitz, G., Minkel, D. T., Gingrich, D., Shaw, C. F. (1980) The binding of gold(I) to metallothionein. *Journal of Inorganic Biochemistry* 12:293–306.
- [61] Hardcastle, J., Hardcastle, P. T., Kelleher, D. K., Henderson, L. S., Fondacaro, J. D. (1986) Effect of auranofin on absorptive processes in the rat small bowel. *The Journal of Rheumatology* 13:541–546.
- [62] Bindoli, A., Rigobello, M. P., Scutari, G., Gabbiani, C., Casini, A., Messori, L. (2009) Thioredoxin reductase. A target for gold compounds acting as potential anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* 253:1692–1707.
- [63] Kean, W. F., Kean, I. R. L. (2008) Clinical pharmacology of gold. *Inflammopharmacology* 16:112–125.
- [64] Wang, D., Lippard, S. J. (2005) Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature reviews. Drug Discovery* 4:307–320.
- [65] Rosenberg, B. (1971) Some Biological Effects of Platinum Compounds. New agents in the control of tumours. *Platinum Metals Review* 15:42–51.
- [66] Rossi, A., Di Maio, M., Chiodini, P., Rudd, R. M., Okamoto, H., Skarlos, D. V., Fruh, M., Qian, W., Tamura, T., Samantas, E., Shibata, T., Perrone, F., Gallo, C., Gridelli, C., Martelli, O., Lee, S.-M. (2012) Carboplatin- or cisplatin-based chemotherapy in first-line treatment of small-cell lung cancer: the COCIS meta-analysis of individual patient data. *Journal of Clinical Oncology* 30:1692–1698.
- [67] Decatris, M., Sundar, S., O'Byrne, K. (2004) Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer. Current status. *Cancer Treatment Reviews* 30:53–81.
- [68] Jamieson, E. R., Lippard, S. J. (1999) Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chemical Reviews* 99:2467–2498.
- [69] Wheate, N. J., Walker, S., Craig, G. E., Oun, R. (2010) The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials. *Dalton Transactions* 39:8113–8127.
- [70] Clement, J. L., Jarrett, P. S. (1994) Antibacterial silver. *Metal-based drugs* 1:467–482.
- [71] Chopra, I. (2007) The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 59:587–590.

- [72] Krieger, B. R., Davis, D. M., Sanchez, J. E., Mateka, J. J. L., Nfonsam, V. N., Frattini, J. C., Marcet, J. E. (2011) The use of silver nylon in preventing surgical site infections following colon and rectal surgery. *Diseases of the Colon and Rectum* 54:1014–1019.
- [73] Günal, S., Kaloğlu, N., Özdemir, İ., Demir, S., Özdemir, İ. (2012) Novel benzimidazolium salts and their silver complexes. Synthesis and antibacterial properties. *Inorganic Chemistry Communications* 21:142–146.
- [74] Silver, S. (2003) Bacterial silver resistance. Molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 27:341–353.
- [75] Ratte, H. T. (1999) Bioaccumulation and toxicity of silver compounds. A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18:89–108.
- [76] Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. (1995) A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *Journal of the American Chemical Society* 117:5179–5197.
- [77] Fox, C. L. (1968) Silver Sulfadiazine - A New Topical Therapy for Pseudomonas in Burns. *Archives of Surgery* 96(2):184-8.
- [78] Berners-Price, S. J., Johnson, R. K., Giovenella, A. J., Faucette, L. F., Mirabelli, C. K., Sadler, P. J. (1988) Antimicrobial and anticancer activity of tetrahedral, chelated, diphosphine silver(I) complexes. Comparison with copper and gold. *Journal of Inorganic Biochemistry* 33:285–295.
- [79] Melaiye, A., Simons, R. S., Milsted, A., Pingitore, F., Wesdemiotis, C., Tessier, C. A., Youngs, W. J. (2004) Formation of water-soluble pincer silver(I)-carbene complexes: a novel antimicrobial agent. *Journal of Medicinal Chemistry* 47:973–977.
- [80] Kascatan-Nebioglu, A., Panzner, M. J., Tessier, C. A., Cannon, C. L., Youngs, W. J. (2007) N-Heterocyclic carbene–silver complexes. A new class of antibiotics. *Coordination Chemistry Reviews* 251:884–895.
- [81] Patil, S., Deally, A., Gleeson, B., Müller-Bunz, H., Paradisi, F., Tacke, M. (2010) Synthesis, cytotoxicity and antibacterial studies of symmetrically and non-symmetrically benzyl- or p-cyanobenzyl-substituted N-Heterocyclic carbene-silver complexes. *Applied Organometallic Chemistry* 24:781–793.
- [82] Patil, S., Claffey, J., Deally, A., Hogan, M., Gleeson, B., Menéndez Méndez, L. M., Müller-Bunz, H., Paradisi, F., Tacke, M. (2010) Synthesis, Cytotoxicity and Antibacterial Studies of p -Methoxybenzyl-Substituted and Benzyl-Substituted N-Heterocyclic Carbene-Silver Complexes. *European Journal of Inorganic Chemistry* 24(11):781–793.

- [83] Patil, S., Deally, A., Gleeson, B., Muller-Bunz, H., Paradisi, F., Tacke, M. (2011) Novel benzyl-substituted N-heterocyclic carbene-silver acetate complexes: synthesis, cytotoxicity and antibacterial studies. *Metallomics* 3:74–88.
- [84] Patil, S., Deally, A., Hackenberg, F., Kaps, L., Müller-Bunz, H., Schobert, R., Tacke, M. (2011) Novel Benzyl- or 4-Cyanobenzyl-Substituted N-Heterocyclic (Bromo)(carbene)silver(I) and (Carbene)(chloro)gold(I) Complexes. Synthesis and Preliminary Cytotoxicity Studies. *Helvetica Chimica Acta* 94:1551–1562.
- [85] Streciwilk, W., Cassidy, J., Hackenberg, F., Müller-Bunz, H., Paradisi, F., Tacke, M. (2014) Synthesis, cytotoxic and antibacterial studies of p-benzyl-substituted NHC–silver(I) acetate compounds derived from 4,5-di-p-diisopropylphenyl- or 4,5-di-p-chlorophenyl-1H-imidazole. *Journal of Organometallic Chemistry* 749:88–99.
- [86] Butorac, R. R., Al-Deyab, S. S., Cowley, A. H. (2011) Antimicrobial properties of some bis(iminoacenaphthene (BIAN)-supported N-heterocyclic carbene complexes of silver and gold. *Molecules* 16:2285–2292.
- [87] Luqmani, Y. A. (2005) Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. Medical principles and practice. *International Journal of the Kuwait University* 14(1):35–48.
- [88] Persidis, A. (1999) Cancer multidrug resistance. *Nature Biotechnology* 17:94–95.
- [89] Siddik, Z. H. (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22:7265–7279.
- [90] Vasiliou, V., Vasiliou, K., Nebert, D. W. (2008) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Human Genomics* 3(3): 281–290.
- [91] Barrett, M. L., Lewis, G. P. (1986) Unique properties of auranofin as a potential anti-rheumatic drug. *Agents and Actions* 19:109–115.
- [92] Gamberi, T., Fiaschi, T., Modesti, A., Massai, L., Messori, L., Balzi, M., Magherini, F. (2015) Evidence that the antiproliferative effects of auranofin in *Saccharomyces cerevisiae* arise from inhibition of mitochondrial respiration. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 65:61–71.
- [93] Kim, N.-H., Park, H. J., Oh, M.-K., Kim, I.-S. (2013) Antiproliferative effect of gold(I) compound auranofin through inhibition of STAT3 and telomerase activity in MDA-MB 231 human breast cancer cells. *BMB reports* 46:59–64.
- [94] Varghese, E., Busselberg, D. (2014) Auranofin, an anti-rheumatic gold compound, modulates apoptosis by elevating the intracellular calcium concentration (Ca^{2+}) in mcf-7 breast cancer cells. *Cancers* 6:2243–2258.

- [95] Hokai, Y., Jurkowicz, B., Fernandez-Gallardo, J., Zakirkhodjaev, N., Sanau, M., Muth, T. R., Contel, M. (2014) Auranofin and related heterometallic gold(I)-thiolates as potent inhibitors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. *Journal of Inorganic Biochemistry* 138:81–88.
- [96] Novelli, F., Recine, M., Sparatore, F., Juliano, C. (1999) Gold(I) complexes as antimicrobial agents. *Farmaco* 54:232–236.
- [97] Özdemir, İ., Denizci, A., Öztürk, H. T., Çetinkaya, B. (2004) Synthetic and antimicrobial studies on new gold(I) complexes of imidazolidin-2-ylidenes. *Applied Organometallic Chemistry* 18:318–322.
- [98] Elzatahry, A. A., Al-Enizi, A. M., Elsayed, E. A., Butorac, R. R., Al-Deyab, S. S., Wadaan, M. A. M., Cowley, A. H. (2012) Nanofiber composites containing N-heterocyclic carbene complexes with antimicrobial activity. *International Journal of Nanomedicine* 7:2829–2832.
- [99] Ozdemir, I., Temelli, N., Gunal, S., Demir, S. (2010) Gold(I) complexes of N-heterocyclic carbene ligands containing benzimidazole: synthesis and antimicrobial activity. *Molecules* 15:2203–2210.
- [100] Samanta, T., Roymahapatra, G., Porto, W. F., Seth, S., Ghorai, S., Saha, S., Sengupta, J., Franco, O. L., Dinda, J., Mandal, S. M. (2013) N, N'-Olefin functionalized bis-imidazolium gold(I) salt is an efficient candidate to control keratitis-associated eye infection. *PLoS One* 8(3):e58346.
- [101] Fernández, G. A., Picco, A. S., Ceoñín, M. R., Chopa, A. B., Silbestri, G. F. (2013) Synthesis and Structural Characterization of Water-Soluble Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes. An X-ray Absorption Fine Structure Spectroscopy (XAFS) Study. *Organometallics* 32:6315–6323.
- [102] Wanzlick, H.-W., Schikora, E. (1960) Ein neuer Zugang zur Carben-Chemie. *Angewandte Chemie* 72(14):494.
- [103] Wanzlick, H.-W., Schikora, E. (1961) Ein nucleophiles Carben. *Chemische Berichte* 94:2389–2393.
- [104] Wanzlick, H. W. (1962) Aspects of Nucleophilic Carbene Chemistry. *Angewandte Chemie* 1:75–80.
- [105] Böhm, V. P. W., Herrmann, W. A. (2000) The "Wanzlick Equilibrium". *Angewandte Chemie* 39:4036–4038.

- [106] Denk, M. K., Hatano, K., Ma, M. (1999) Nucleophilic carbenes and the wanzlick equilibrium. A reinvestigation. *Tetrahedron Letters* 40:2057–2060.
- [107] Liu, Y., Lindner, P. E., Lemal, D. M. (1999) Thermodynamics of a Diaminocarbene–Tetraaminoethylene Equilibrium. *Journal of the American Chemical Society* 121:10626–10627.
- [108] Wanzlick, H.-W., Schönherr, H.-J. (1968) Direkt-Synthese eines Quecksilbersalz-Carben-Komplexes. *Angewandte Chemie* 80:154.
- [109] Schönherr, H.-J., Wanzlick, H.-W. (1970) Chemie nucleophiler Carbene, XX HX-Abspaltung aus 1.3-Diphenyl-imidazoliumsalzen. Quecksilbersalz-Carben-Komplexe. *Chemische Berichte* 103:1037–1046.
- [110] Kirmse, W. (2010) The beginnings of N-heterocyclic carbenes. *Angewandte Chemie* 49:8798–8801.
- [111] Arduengo, A. J., Harlow, R. L., Kline, M. (1991) A stable crystalline carbene. *Journal of the American Chemical Society* 113:361–363.
- [112] Hillier, A. C., Grasa, G. A., Viciu, M. S., Lee, H. M., Yang, C., Nolan, S. P. (2002) Catalytic cross-coupling reactions mediated by palladium/nucleophilic carbene systems. *Journal of Organometallic Chemistry* 653:69–82.
- [113] Heck, R. F., Nolley, J. P. (1972) Palladium-catalyzed vinylic hydrogen substitution reactions with aryl, benzyl, and styryl halides. *The Journal of Organic Chemistry* 37:2320–2322.
- [114] Fürstner, A. (2000) Olefin Metathesis and Beyond. *Angewandte Chemie* 39:3012–3043.
- [115] Trnka, T. M., Grubbs, R. H. (2001) The Development of L₂X₂RuCHR Olefin Metathesis Catalysts. An Organometallic Success Story. *Accounts of Chemical Research* 34:18–29.
- [116] Oehninger, L., Rubbiani, R., Ott, I. (2013) N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry. *Dalton Transactions* 42:3269–3284.
- [117] Gasser, G., Ott, I., Metzler-Nolte, N. (2011) Organometallic Anticancer Compounds. *Journal of Medicinal Chemistry* 54:3–25.
- [118] Bertrand, B., Casini, A. (2014) A golden future in medicinal inorganic chemistry. The promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Transactions* 43:4209–4219.

- [119] Bertrand, B., Doulain, P. E., Goze, C., Bodio, E. (2016) Development of trackable metal-based drugs: new generation of therapeutic agents. *Dalton Transactions* 45:13005-13011.
- [120] Zou, T., Lum, C. T., Lok, C. N., Zhang, J. J., Che, C. M. (2015) Chemical biology of anticancer gold(III) and gold(I) complexes. *Chemical Society Reviews* 44:8786–8801.
- [121] Spreckelmeyer, S., Orvig, C., Casini, A. (2014) Cellular transport mechanisms of cytotoxic metallodrugs: an overview beyond cisplatin. *Molecules* 19:15584–15610.
- [122] Gavara, R., Aguiló, E., Schur, J., Llorca, J., Ott, I., Rodríguez, L. (2016) Study of the effect of the chromophore and nuclearity on the aggregation and potential biological activity of gold(I) alkynyl complexes. *Inorganica Chimica Acta* 446:189–197.
- [123] Ott, I. (2009) On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. *Coordination Chemistry Reviews* 253:1670–1681.
- [124] Liu, W., Gust, R. (2013) Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. *Chemical Society Reviews* 42:755–773.
- [125] Hahn, F. E., Jahnke, M. C. (2008) Heterocyclic carbenes: synthesis and coordination chemistry. *Angewandte Chemie* 47:3122–3172.
- [126] Frémont, P. de, Marion, N., Nolan, S. P. (2009) Carbenes. Synthesis, properties, and organometallic chemistry. *Coordination Chemistry Reviews* 253:862–892.
- [127] Herrmann, W. A., Köcher, C. (1997) N-Heterocyclic Carbenes. *Angewandte Chemie* 36:2162–2187.
- [128] Alcarazo, M., Roseblade, S. J., Alonso, E., Fernandez, R., Alvarez, E., Lahoz, F. J., Lassaletta, J. M. (2004) 1,3-Bis(N,N-dialkylamino)imidazolin-2-ylidenes: synthesis and reactivity of a new family of stable N-heterocyclic carbenes. *Journal of the American Chemical Society* 126:13242–13243.
- [129] Hopkinson, M. N., Richter, C., Schedler, M., Glorius, F. (2014) An overview of N-heterocyclic carbenes. *Nature* 510:485–496.
- [130] Minghetti, G., Bonati, F. (1973) Bis(carbene) complexes of gold(I) and gold (III). *Journal of Organometallic Chemistry* 54:C62-C63.
- [131] Parks, J. E., Balch, A. L. (1973) Gold carbene complexes as intermediates in the α -addition of amines to isocyanides. *Journal of Organometallic Chemistry* 57:C103-C106.
- [132] Parks, J. E., Balch, A. L. (1974) Gold carbene complexes. Preparation, oxidation, and ligand displacement. *Journal of Organometallic Chemistry* 71:453–463.

- [133] Fremont, P. de, Stevens, E. D., Fructos, M. R., Mar Diaz-Requejo, M., Perez, P. J., Nolan, S. P. (2006) Synthesis, isolation and characterization of cationic gold(I) N-heterocyclic carbene (NHC) complexes. *Chemical Communications* 2045–2047.
- [134] Nobili, S., Mini, E., Landini, I., Gabbiani, C., Casini, A., Messori, L. (2010) Gold compounds as anticancer agents: chemistry, cellular pharmacology, and preclinical studies. *Medicinal Research Reviews* 30:550–580.
- [135] Sadler, P. J., Sue, R. E. (1994) The chemistry of gold drugs. *Metal-based Drugs* 1:107–144.
- [136] Crooke, S. T., Snyder, R. M., Butt, T. R., Ecker, D. J., Allaudeen, H. S., Monia, B., Mirabelli, C. K. (1986) Cellular and molecular pharmacology of auranofin and related gold complexes. *Biochemical Pharmacology* 35:3423–3431.
- [137] Messori, L., Marcon, G., Orioli, P. (2003) Gold(III) compounds as new family of anticancer drugs. *Bioinorganic Chemistry and Applications* 1(2): 177–187.
- [138] Blumenthal, G., Linke, D., Vieth, S. (2006) *Chemie. Grundwissen für Ingenieure*. B.G. 1. Auflage, Teubner Verlag / GWV Fachverlage GmbH Wiesbaden, Wiesbaden.
- [139] Gade, L. H., Lewis, J. (2010) *Koordinationschemie*, 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
- [140] Isab, A. A., Shaw, C. F., Hoeschele, J. D., Locke, J. (1988) Reactions of trimethylphosphine analogs of auranofin with bovine serum albumin. *Inorganic Chemistry* 27:3588–3592.
- [141] Roberts, J. R., Xiao, J., Schliesman, B., Parsons, D. J., Shaw, C. F. (1996) Kinetics and Mechanism of the Reaction between Serum Albumin and Auranofin (and Its Isopropyl Analogue) in Vitro. *Inorganic Chemistry* 35:424–433.
- [142] Messori, L., Balerna, A., Ascone, I., Castellano, C., Gabbiani, C., Casini, A., Marchioni, C., Jaouen, G., Congiu, C. A. (2011) X-ray absorption spectroscopy studies of the adducts formed between cytotoxic gold compounds and two major serum proteins. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 16:491–499.
- [143] Mirabelli, C. K., Johnson, R. K., Sung, C. M., Faucette, L., Muirhead, K., Crooke, S. T. (1985) Evaluation of the in vivo antitumor activity and in vitro cytotoxic properties of auranofin, a coordinated gold compound, in murine tumor models. *Cancer Research* 45:32–39.
- [144] Rubbiani, R., Can, S., Kitanovic, I., Alborzinia, H., Stefanopoulou, M., Kokoschka, M., Mönchgesang, S., Sheldrick, W. S., Wölfl, S., Ott, I. (2011) Comparative in Vitro Evaluation

of N-Heterocyclic Carbene Gold(I) Complexes of the Benzimidazolylidene Type. *Journal of Medicinal Chemistry* 54:8646–8657.

- [145] Che, C.-M., Sun, R. W.-Y., Yu, W.-Y., Ko, C.-B., Zhu, N., Sun, H. (2003) Gold(III) porphyrins as a new class of anticancer drugs. Cytotoxicity, DNA binding and induction of apoptosis in human cervix epitheloid cancer cells. *Chemical Communications* 1718-1719.
- [146] Zhang, X., Frezza, M., Milacic, V., Ronconi, L., Fan, Y., Bi, C., Fregona, D., Dou, Q. P. (2010) Inhibition of tumor proteasome activity by gold-dithiocarbamate complexes via both redox-dependent and -independent processes. *Journal of Cellular Biochemistry* 109:162–172.
- [147] Baumeister, W., Lupas, A. (1997) The proteasome. *Current Opinion in Structural Biology* 7:273–278.
- [148] Stock, D., Niederlof, P. M., Seemüller, E., Baumeister, W., Huber, R., Löwe, J. (1996) Proteasome. From structure to function. *Current Opinion in Biotechnology* 7:376–385.
- [149] Varshavsky, A. (1997) The ubiquitin system. *Trends in Biochemical Sciences* 22:383–387.
- [150] Dalla Via, L., Nardon, C., Fregona, D. (2012) Targeting the ubiquitin-proteasome pathway with inorganic compounds to fight cancer: a challenge for the future. *Future Medicinal Chemistry* 4:525–543.
- [151] Almeida, A. de, Oliveira, B. L., Correia, J. D., Soveral, G., Casini, A. (2013) Emerging protein targets for metal-based pharmaceutical agents. An update. *Coordination Chemistry Reviews* 257:2689–2704.
- [152] Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* 376:37–43.
- [153] Papworth, M., Kolasinska, P., Minczuk, M. (2006) Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene* 366:27–38.
- [154] Höffeler, F. (2004) Die Maschinerie der Apoptose. *Chronik eines angekündigten Todes. Biologie in unserer Zeit* 34:16–23.
- [155] Holenya, P., Can, S., Rubbiani, R., Alborzinia, H., Jünger, A., Cheng, X., Ott, I., Wölfl, S. (2014) Detailed analysis of pro-apoptotic signaling and metabolic adaptation triggered by a N-heterocyclic carbene–gold(I) complex. *Metallomics* 6:1591–1601.

- [156] Berners-Price, S. J., Filipovska, A. (2011) Gold compounds as therapeutic agents for human diseases. *Metallomics* 3:863–873.
- [157] Hickey, J. L., Ruhayel, R. A., Barnard, P. J., Baker, M. V., Berners-Price, S. J., Filipovska, A. (2008) Mitochondria-targeted chemotherapeutics: the rational design of gold(I) N-heterocyclic carbene complexes that are selectively toxic to cancer cells and target protein selenols in preference to thiols. *Journal of the American Chemical Society* 130:12570–12571.
- [158] Cheng, X., Holenya, P., Can, S., Alborzinia, H., Rubbiani, R., Ott, I., Wölfl, S. (2014) A TrxR inhibiting gold(I) NHC complex induces apoptosis through ASK1-p38-MAPK signaling in pancreatic cancer cells. *Molecular Cancer* 13:(221)1-15.
- [159] Messori, L., Scaletti, F., Massai, L., Cinellu, M. A., Russo, K. I., Di Martino, G., Vergara, A., Paduano, L., Merlino, A. (2014) Interactions of gold-based drugs with proteins: crystal structure of the adduct formed between ribonuclease A and a cytotoxic gold(III) compound. *Metallomics* 6:233–236.
- [160] Zou, J., Taylor, P., Dornan, J., Robinson, S. P., Walkinshaw, M. D., Sadler, P. J. (2000) First Crystal Structure of a Medicinally Relevant Gold Protein Complex. Unexpected Binding of $[\text{Au}(\text{PEt}_3)]^+$ to Histidine. *Angewandte Chemie* 39:2931–2934.
- [161] Sun, R. W.-Y., Li, C. K.-L., Ma, D.-L., Yan, J. J., Lok, C.-N., Leung, C.-H., Zhu, N., Che, C.-M. (2010) Stable anticancer gold(III)-porphyrin complexes: effects of porphyrin structure. *Chemistry* 16:3097–3113.
- [162] Zhang, J. J., Ng, K. M., Lok, C. N., Sun, R. W., Che, C. M. (2013) Deubiquitinases as potential anti-cancer targets for gold(III) complexes. *Chemical Communications* 49:5153–5155.
- [163] Argyrou, A., Blanchard, J. S. (2004) Flavoprotein Disulfide Reductases. *Advances in Chemistry and Function* 78:89–142.
- [164] Penzer, G. R., Radda, G. K. (1967) The chemistry and biological function of isoalloxazines (flavines). *Quarterly Review of the Chemical Society* 21:43-65.
- [165] Williams, C. H., Arscott, L. D., Müller, S., Lennon, B. W., Ludwig, M. L., Wang, P. F., Veine, D. M., Becker, K., Schirmer, R. H. (2000) Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *European Journal of Biochemistry* 267:6110–6117.
- [166] Mustacich, D., Powis, G. (2000) Thioredoxin reductase. *Biochemical Journal* 346:1–8.
- [167] Powis, G., Montfort, W. R. (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 41:261–295.

- [168] Mahmood, D. F. D., Abderrazak, A., El Hadri, K., Simmet, T., Rouis, M. (2013) The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. *Antioxidants & Redox Signaling* 19:1266–1303.
- [169] Berggren, M. I., Husbeck, B., Samulitis, B., Baker, A. F., Gallegos, A., Powis, G. (2001) Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392:103–109.
- [170] Nordlund, P., Reichard, P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annual Review of Biochemistry* 75:681–706.
- [171] Fahey, R.C., Brown, W.C., Adams, W.B., Worsham, M.B. (1978) Occurrence of glutathione in bacteria. *Journal of Bacteriology* 133:1126–1129.
- [172] Lu, J., Vlamis-Gardikas, A., Kandasamy, K., Zhao, R., Gustafsson, T. N., Engstrand, L., Hoffner, S., Engman, L., Holmgren, A. (2013) Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione. *FASEB Journal* 27:1394–1403.
- [173] Lu, J., Holmgren, A. (2014) The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine* 66:75–87.
- [174] Fernandes, A. P., Holmgren, A. (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxidants & Redox Signaling* 6:63–74.
- [175] Morris, G., Anderson, G., Dean, O., Berk, M., Galecki, P., Martin-Subero, M., Maes, M. (2014) The glutathione system: a new drug target in neuroimmune disorders. *Molecular Neurobiology* 50:1059–1084.
- [176] Lushchak, V. I. (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *Journal of Amino Acids* 1-26.
- [177] Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A., Schneider, G. (2001) Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98:9533–9538.
- [178] Zhong, L., Arner, E. S. J., Holmgren, A. (2000) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase. The active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:5854–5859.

- [179] Nordberg, J., Arner, E. S. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radical Biology & Medicine* 31:1287–1312.
- [180] Gasdaska, P. Y., Gasdaska, J. R., Cochran, S., Powis, G. (1995) Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Letters* 373:5–9.
- [181] Fritz-Wolf, K., Kehr, S., Stumpf, M., Rahlfs, S., Becker, K. (2011) Crystal structure of the human thioredoxin reductase-thioredoxin complex. *2(383):1-8*.
- [182] Williams, C. H. (1995) Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *FASEB Journal* 9:1267–1276.
- [183] Veine, D. M., Mulrooney, S. B., Wang, P. F., Williams, C. H., JR (1998) Formation and properties of mixed disulfides between thioredoxin reductase from *Escherichia coli* and thioredoxin: evidence that cysteine-138 functions to initiate dithiol-disulfide interchange and to accept the reducing equivalent from reduced flavin. *Protein science* 7:1441–1450.
- [184] Xu, Z., Yang, Z., Liu, Y., Lu, Y., Chen, K., Zhu, W. (2014) Halogen Bond. Its Role beyond Drug–Target Binding Affinity for Drug Discovery and Development. *Journal of Chemical Information and Modeling* 54:69–78.
- [185] Lommerse, J. P. M., Stone, A. J., Taylor, R., Allen, F. H. (1996) The Nature and Geometry of Intermolecular Interactions between Halogens and Oxygen or Nitrogen. *Journal of the American Chemical Society* 118:3108–3116.
- [186] Clark, T., Hennemann, M., Murray, J. S., Politzer, P. (2007) Halogen bonding. The σ -hole. *Journal of Molecular Modeling* 13:291–296.
- [187] Politzer, P., Murray, J. S., Clark, T. (2013) Halogen bonding and other σ -hole interactions. A perspective. *Physical Chemistry Chemical Physics* 15:11178-11189.
- [188] Bondi, A. (1964) van der Waals Volumes and Radii. *The Journal of Physical Chemistry* 68:441–451.
- [189] Haynes, W. M., Lide, D. R. (2015) *CRC handbook of chemistry and physics. A ready-reference book of chemical and physical data*, 96. ed., 2015-2016. CRC Press, Boca Raton.
- [190] Bohm, H. J., Banner, D., Bendels, S., Kansy, M., Kuhn, B., Muller, K., Obst-Sander, U., Stahl, M. (2004) Fluorine in medicinal chemistry. *European Journal of Chemical Biology* 5:637–643.
- [191] Isanbor, C., O'Hagan, D. (2006) Fluorine in medicinal chemistry. A review of anti-cancer agents. *Journal of Fluorine Chemistry* 127:303–319.

- [192] Gillis, E. P., Eastman, K. J., Hill, M. D., Donnelly, D. J., Meanwell, N. A. (2015) Applications of Fluorine in Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* 58:8315–8359.
- [193] Shah, P., Westwell, A. D. (2008) The role of fluorine in medicinal chemistry. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 22:527–540.
- [194] Kirk, K. L. (2006) Fluorine in medicinal chemistry. Recent therapeutic applications of fluorinated small molecules. *Journal of Fluorine Chemistry* 127:1013–1029.
- [195] Kirk, K. L. (2006) Selective fluorination in drug design and development: an overview of biochemical rationales. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 6:1447–1456.
- [196] Hagmann, W. K. (2008) The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry* 51:4359–4369.
- [197] Ismail, F. M. (2002) Important fluorinated drugs in experimental and clinical use. *Journal of Fluorine Chemistry* 118:27–33.
- [198] Dugar, S., Yumibe, N., Clader, J. W., Vizziano, M., Huie, K., van Heek, M., Compton, D. S., Davis, H. R. (1996) Metabolism and structure activity data based drug design. Discovery of (–) SCH 53079 an analog of the potent cholesterol absorption inhibitor (–) SCH 48461. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 6:1271–1274.
- [199] Penning, T. D., Talley, J. J., Bertenshaw, S. R., Carter, J. S., Collins, P. W., Docter, S., Graneto, M. J., Lee, L. F., Malecha, J. W., Miyashiro, J. M., Rogers, R. S., Rogier, D. J., Yu, S. S., AndersonGD, Burton, E. G., Cogburn, J. N., Gregory, S. A., Koboldt, C. M., Perkins, W. E., Seibert, K., Veenhuizen, A. W., Zhang, Y. Y., Isakson, P. C. (1997) Synthesis and biological evaluation of the 1,5-diarylpyrazole class of cyclooxygenase-2 inhibitors: identification of 4-5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-ylbenzenesulfonamide (SC-58635, celecoxib). *Journal of Medicinal Chemistry* 40:1347–1365.
- [200] van Niel, M. B., Collins, I., Beer, M. S., Broughton, H. B., Cheng, S. K., Goodacre, S. C., Heald, A., Locker, K. L., MacLeod, A. M., Morrison, D., Moyes, C. R., O'Connor, D., Pike, A., Rowley, M., Russell, M. G., Sohal, B., Stanton, J. A., Thomas, S., Verrier, H., Watt, A. P., Castro, J. L. (1999) Fluorination of 3-(3-(piperidin-1-yl)propyl)indoles and 3-(3-(piperazin-1-yl)propyl)indoles gives selective human 5-HT_{1D} receptor ligands with improved pharmacokinetic profiles. *Journal of Medicinal Chemistry* 42:2087–2104.
- [201] Maren, T. H., Conroy, C. W. (1993) A new class of carbonic anhydrase inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry* 268:26233–26239.
- [202] Kokuryo, Y., Kawata, K., Nakatani, T., Kugimiya, A., Tamura, Y., Kawada, K., Matsumoto, M., Suzuki, R., Kuwabara, K., Hori, Y., Ohtani, M. (1997) Synthesis and

evaluation of novel fluorinated methotrexate derivatives for application to rheumatoid arthritis treatment. *Journal of Medicinal Chemistry* 40:3280–3291.

- [203] Domagala, J. M., Hanna, L. D., Heifetz, C. L., Hutt, M. P., Mich, T. F., Sanchez, J. P., Solomon, M. (1986) New structure-activity relationships of the quinolone antibacterials using the target enzyme. The development and application of a DNA gyrase assay. *Journal of Medicinal Chemistry* 29:394–404.
- [204] Qiu, J., Stevenson, S. H., O'Beirne, M. J., Silverman, R. B. (1999) 2,6-Difluorophenol as a bioisostere of a carboxylic acid: bioisosteric analogues of gamma-aminobutyric acid. *Journal of Medicinal Chemistry* 42:329–332.
- [205] Heidelberger, C., Chaudhuri, N. K., Danneberg, P., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R. J., Plevin, E., Scheiner, J. (1957) Fluorinated pyrimidines, a new class of tumour-inhibitory compounds. *Nature* 179:663–666.
- [206] Li, L., Wang, H.-K., Kuo, S.-C., Wu, T.-S., Mauger, A., Lin, C. M., Hamel, E., Lee, K.-H. (1994) Antitumor Agents 155. Synthesis and Biological Evaluation of 3',6,7-Substituted 2-Phenyl-4-quinolones as Antimicrotubule Agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 37:3400–3407.
- [207] Langton, K. P., Henderson, P. J. F., Herbert, R. B. (2005) Antibiotic resistance: multidrug efflux proteins, a common transport mechanism? *Natural Product Reports* 22:439–451.
- [208] Yu, M., Ocana, A., Tannock, I. F. (2013) Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? *Cancer Metastasis Reviews* 32:211–227.
- [209] Gottesman, M. M., Pastan, I. H. (2015) The Role of Multidrug Resistance Efflux Pumps in Cancer: Revisiting a JNCI Publication Exploring Expression of the MDR1 (P-glycoprotein) Gene. *Journal of the National Cancer Institute* 107(9):1-3.
- [210] Abu Ajaj, K., Graeser, R., Kratz, F. (2012) Zosuquidar and an albumin-binding prodrug of zosuquidar reverse multidrug resistance in breast cancer cells of doxorubicin and an albumin-binding prodrug of doxorubicin. *Breast Cancer Research and Treatment* 134:117–129.
- [211] Mello, P. A., Barin, J. S., Duarte, F. A., Bizzi, C. A., Diehl, L. O., Muller, E. I., Flores, E. M. M. (2013) Analytical methods for the determination of halogens in bioanalytical sciences: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 405:7615–7642.
- [212] Taflik, T., Duarte, F. A., Flores, É. L. M., Antes, F. G., Paniz, J. N. G., Flores, É. M. M., Dressler, V. L. (2012) Determination of bromine, fluorine and iodine in mineral

supplements using pyrohydrolysis for sample preparation. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 23:488–495.

- [213] Lewen, N. (2011) The use of atomic spectroscopy in the pharmaceutical industry for the determination of trace elements in pharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55:653–661.
- [214] Analytik Jena Grundlagen. Instrumentation und Techniken der Atomabsorptionsspektroskopie.
<https://www.yumpu.com/de/document/view/10721079/grundlagen-instrumentation-und-techniken>. Zuletzt abgerufen am 15.11.2016.
- [215] Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Huang, M. D., Okruss, M., Radziuk, B. (2006) Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology. A historical perspective. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61:1015–1030.
- [216] Welz, B., Borges, D. L., Lepri, F. G., Vale, M. G. R., Heitmann, U. (2007) High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry — An analytical and diagnostic tool for trace analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62:873–883.
- [217] Tsunoda, K.-i., Haraguchi, H., Fuwa, K. (1980) Studies on the occurrence of atoms and molecules of aluminum, gallium, indium and their monohalides in an electrothermal carbon furnace. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 35:715–729.
- [218] Heitmann, U., Becker-Ross, H., Florek, S., Huang, M. D., Okruss, M. (2006) Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21:1314–1320.
- [219] Welz, B., Lepri, F. G., Araujo, R. G. O., Ferreira, S. L. C., Huang, M.-D., Okruss, M., Becker-Ross, H. (2009) Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces - A review. *Analytica Chimica Acta* 647:137–148.
- [220] Ozbek, N., Akman, S. (2013) Determination of total sulfur in food samples by solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:4816–4821.
- [221] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M. (2006) Determination of halogens via molecules in the air-acetylene flame using high-resolution continuum source absorption spectrometry. Part I. Fluorine. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61:572–578.

- [222] Ozbek, N., Akman, S. (2013) Determination of fluorine in milk samples via calcium-monofluoride by electrothermal molecular absorption spectrometry. *Food Chemistry* 138:650–654.
- [223] Ozbek, N., Akman, S. (2012) Method development for the determination of fluorine in toothpaste via molecular absorption of aluminum mono fluoride using a high-resolution continuum source nitrous oxide/acetylene flame atomic absorption spectrophotometer. *Talanta* 94:246–250.
- [224] Qin, Z., Raab, A., Krupp, E., Deng, H., Feldmann, J. (2013) Mining complex bacteria media for all fluorinated compounds made possible by using HPLC coupled parallel to fluorine-specific and molecular specific detection. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28:877-882.
- [225] Buckner, S., Acker, J. (2012) Spectrometric analysis of process etching solutions of the photovoltaic industry—determination of HNO₃, HF, and H₂SiF₆ using high-resolution continuum source absorption spectrometry of diatomic molecules and atoms. *Talanta* 94:335–341.
- [226] Ozbek, N., Akman, S. (2012) Method development for the determination of fluorine in water samples via the molecular absorption of strontium monofluoride formed in an electrothermal atomizer. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 69:32–37.
- [227] Krüger, M., Huang, M.-D., Becker-Roß, H., Florek, S., Ott, I., Gust, R. (2012) Quantification of the fluorine containing drug 5-fluorouracil in cancer cells by GaF molecular absorption via high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 69:50–55.
- [228] Resano, M., Briceño, J., Belarra, M. A. (2009) Direct determination of phosphorus in biological samples using a solid sampling-high resolution-continuum source electrothermal spectrometer. Comparison of atomic and molecular absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24:1343-1354.
- [229] Morés, S., Monteiro, G. C., Santos, F. d. S., Carasek, E., Welz, B. (2011) Determination of fluorine in tea using high-resolution molecular absorption spectrometry with electrothermal vaporization of the calcium mono-fluoride CaF. *Talanta* 85:2681–2685.
- [230] Gleisner, H., Einax, J. W., Morés, S., Welz, B., Carasek, E. (2011) A fast and accurate method for the determination of total and soluble fluorine in toothpaste using high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry and its comparison with established techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54:1040–1046.

- [231] Gleisner, H., Welz, B., Einax, J. W. (2010) Optimization of fluorine determination via the molecular absorption of gallium mono-fluoride in a graphite furnace using a high-resolution continuum source spectrometer. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 65:864–869.
- [232] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M. (2006) Determination of halogens via molecules in the air–acetylene flame using high-resolution continuum source absorption spectrometry, Part II. Chlorine. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61:959–964.
- [233] Fechetia, M., Tognon, A. L., da Veiga, M. A. (2012) Determination of chlorine in food samples via the AlCl molecule using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 71-72:98–101.
- [234] Flórez, M. R., Resano, M. (2013) Direct determination of bromine in plastic materials by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 88:32–39.
- [235] Limburg, T., Einax, J. W. (2013) Determination of bromine using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. *Microchemical Journal* 107:31–36.
- [236] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M. (2008) High-resolution continuum source electrothermal absorption spectrometry of AlBr and CaBr for the determination of bromine. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63:566–570.
- [237] Pereira, É. R., Castilho, I. N., Welz, B., Gois, J. S., Borges, D. L., Carasek, E., Andrade, J. B. de (2014) Method development for the determination of bromine in coal using high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 96:33–39.
- [238] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Okruss, M., Welz, B., Morés, S. (2009) Determination of iodine via the spectrum of barium mono-iodide using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64:697–701.
- [239] Ferreira, H. S., Lepri, F. G., Welz, B., Carasek, E., Huang, M.-D. (2010) Determination of sulfur in biological samples using high-resolution molecular absorption

spectrometry in a graphite furnace with direct solid sampling. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25:1039-1045.

- [240] Resano, M., Flórez, M. R. (2012) Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27:401-412.
- [241] Mior, R., Mores, S., Welz, B., Carasek, E., Andrade, J. B. de (2013) Determination of sulfur in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry of the CS molecule in a graphite furnace. *Talanta* 106:368–374.
- [242] Nakadi, F. V., Rosa, L. R., da Veiga, M. A. (2013) Determination of sulfur in coal and ash slurry by high-resolution continuum source electrothermal molecular absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 88:80–84.
- [243] Baumbach, G., Limburg, T., Einax, J. W. (2013) Quantitative determination of sulfur by high-resolution graphite furnace molecular absorption spectrometry. *Microchemical Journal* 106:295–299.
- [244] Kowalewska, Z. (2011) Feasibility of high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in flame and furnace for sulphur determination in petroleum products. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 66:546–556.
- [245] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M. (2005) Direct determination of total sulfur in wine using a continuum-source atomic-absorption spectrometer and an air-acetylene flame. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382:1877–1881.
- [246] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M. (2006) Determination of sulfur by molecular absorption of carbon monosulfide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air-acetylene flame. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61:181–188.
- [247] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M., Patz, C.-D. (2008) Determination of sulfur forms in wine including free and total sulfur dioxide based on molecular absorption of carbon monosulfide in the air-acetylene flame. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 390:361–367.
- [248] Baysal, A., Akman, S. (2011) A practical method for the determination of sulphur in coal samples by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* 85:2662–2665.

- [249] Bechlin, M. A., Gomes Neto, J. A., Nóbrega, J. A. (2013) Evaluation of lines of boron, phosphorus and sulfur by high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry for plant analysis. *Microchemical Journal* 109:134–138.
- [250] Lepri, F. G., Dessuy, M. B., Vale, M. G. R., Borges, D. L., Welz, B., Heitmann, U. (2006) Investigation of chemical modifiers for phosphorus in a graphite furnace using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 61:934–944.
- [251] Dessuy, M. B., Vale, M. G. R., Lepri, F. G., Welz, B., Heitmann, U. (2007) Investigation of phosphorus atomization using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62:429–434.
- [252] Dessuy, M. B., Vale, M. G. R., Lepri, F. G., Borges, D. L., Welz, B., Silva, M. M., Heitmann, U. (2008) Investigation of artifacts caused by deuterium background correction in the determination of phosphorus by electrothermal atomization using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 63:337–348.
- [253] Lepri, F. G., Welz, B., Dessuy, M. B., Vale, M. G. R., Bohrer, D., Loos-Vollebregt, M. T. de, Huang, M. D., Becker-Ross, H. (2010) Investigation of the feasibility to use Zeeman-effect background correction for the graphite furnace determination of phosphorus using high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry as a diagnostic tool. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 65:24–32.
- [254] Kumar, S. J., Meeravali, N. N., Manjusha, R. (2013) A sensitive method for determination of phosphorous by continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry after a novel ionic liquid assisted cloud point extraction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 28:585–592.
- [255] Campos, R. C. de, Correia, C. L. T., Vieira, F., Saint’Pierre, T. D., Oliveira, A. C., Gonçalves, R. (2011) Direct determination of P in biodiesel by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 66:352–355.
- [256] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M. (2006) Determination of phosphorus by molecular absorption of phosphorus monoxide using a high-resolution continuum source absorption spectrometer and an air–acetylene flame. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21:338–345.

- [257] Huang, M. D., Becker-Ross, H., Florek, S., Heitmann, U., Okruss, M. (2006) The influence of calcium and magnesium on the phosphorus monoxide molecular absorption signal in the determination of phosphorus using a continuum source absorption spectrometer and an air–acetylene flame. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 21:346–349.
- [258] Dominik, A., Steinhilber, D. (2002) *Instrumentelle Analytik. Kurzlehrbuch und kommentierte Originalfragen für Pharmazeuten*, 2. Auflage, Deutscher Apotheker-Verlag, Stuttgart.
- [259] Dittrich, K. (1978) Molekülabsorptionsspektrometrie bei elektrothermischer Verdampfung in einer Graphitrohrküvette. *Analytica Chimica Acta* 97:59–68.
- [260] Dittrich, K., Schneider, S. (1980) Molekülabsorptionsspektrometrie bei elektrothermischer Verdampfung in einer Graphitrohrküvette. *Analytica Chimica Acta* 115:189–200.
- [261] Dittrich, K., Spivakov, B., Shkinev, V. M., Vorob'eva, G. A. (1984) Molecular absorption spectrometry (MAS) by electrothermal evaporation in a graphite furnace - Determination of traces of bromide by mas of AlBr after liquid-liquid extraction of bromide with triphenyltin hydroxide. *Talanta* 31:39–44.
- [262] Parvinen, P., Lajunen, L. H. J. (1990) Determination of Bromine by Aluminium Monobromide Molecular Absorption Spectrometry Using Arsenic Atomic Lines. *Spectroscopy Letters* 23:1321–1330.
- [263] Butcher, D. J. (1993) Determination of Fluorine, Chlorine, and Bromine by Molecular Absorption Spectrometry. *Microchemical Journal* 48:303–317.
- [264] Tsunoda, K., Fujiwara, K., Fuwa, K. (1977) Subnanogram fluorine determination by aluminum monofluoride molecular absorption spectrometry. *Analytical Chemistry* 49:2035–2039.
- [265] Dittrich, K. (1979) Molekülabsorptionsspektrometrie bei elektrothermischer Verdampfung in einer Graphitrohrküvette. *Analytica Chimica Acta* 111:123–135.
- [266] Tsunoda, K., Haraguchi, H., Fuwa, K. (1985) Halide interferences in an electrothermal graphite furnace atomic absorption spectrometry with group IIIB elements as studied by atomic and molecular absorption signal profiles. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 40:1651–1661.
- [267] Dittrich, K. (1978) Molekülabsorptionsspektrometrie bei elektrothermischer Verdampfung in einer Graphitrohrküvette. *Analytica Chimica Acta* 97:69–80.

- [268] Dittrich, K., Vorberg, B. (1982) Molekülabsorptionsspektrometrie bei elektrothermischer Verdampfung in einer Graphitrohrküvette. *Analytica Chimica Acta* 140:237–248.
- [269] de Moraes Flores, Éder Lisandro, Barin, J. S., de Moraes Flores, Érico Marlon, Dressler, V. L. (2007) A new approach for fluorine determination by solid sampling graphite furnace molecular absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62:918–923.
- [270] Ozbek, N., Akman, S. (2015) Determination of fluorine in Turkish wines by molecular absorbance of CaF using a high resolution continuum source atomic absorption spectrometer. *LWT - Food Science and Technology* 61:112–116.
- [271] Würtenberger, I., Gust, R. (2014) A highly sensitive method for in vitro testing of fluorinated drug candidates using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry (HR-CS MAS). *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 406:3431–3442.
- [272] Würtenberger, I., Follia, V., Lerch, F., Cwikla, C., Fahrner, N., Kalchschmidt, C., Flögel, B., Kircher, B., Gust, R. (2015) Fluorinated Fe(III) Salophene Complexes. Optimization of Tumor Cell Specific Activity and Utilization of Fluorine Labeling for in Vitro Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* 58:588–597.
- [273] Oehninger, L., Alborzinia, H., Ludewig, S., Baumann, K., Wölfl, S., Ott, I. (2011) From Catalysts to Bioactive Organometallics. Do Grubbs Catalysts Trigger Biological Effects? *ChemMedChem* 6:2142–2145.
- [274] Rubbiani, R., Kitanovic, I., Alborzinia, H., Can, S., Kitanovic, A., Onambele, L. A., Stefanopoulou, M., Geldmacher, Y., Sheldrick, W. S., Wolber, G., Prokop, A., Wölfl, S., Ott, I. (2010) Benzimidazol-2-ylidene Gold(I) Complexes Are Thioredoxin Reductase Inhibitors with Multiple Antitumor Properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 53:8608–8618.
- [275] Serebryanskaya, T. V., Zolotarev, A. A., Ott, I. (2015) A novel aminotriazole-based NHC complex for the design of gold(I) anti-cancer agents. Synthesis and biological evaluation. *Medicinal Chemical Communications* 6:1186–1189.
- [276] Oehninger, L., Stefanopoulou, M., Alborzinia, H., Schur, J., Ludewig, S., Namikawa, K., Muñoz-Castro, A., Köster, R. W., Baumann, K., Wölfl, S., Sheldrick, W. S., Ott, I. (2013) Evaluation of arene ruthenium(II) N-heterocyclic carbene complexes as organometallics interacting with thiol and selenol containing biomolecules. *Dalton Transactions* 42:1657–1666.

- [277] Oehninger, L., Küster, L. N., Schmidt, C., Muñoz-Castro, A., Prokop, A., Ott, I. (2013) A Chemical-Biological Evaluation of Rhodium(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes as Prospective Anticancer Drugs. *Chemistry* 19:17871–17880.
- [278] Oehninger, L., Spreckelmeyer, S., Holenya, P., Meier, S. M., Can, S., Alborzinia, H., Schur, J., Keppler, B. K., Wölfl, S., Ott, I. (2015) Rhodium(I) N-Heterocyclic Carbene Bioorganometallics as in Vitro Antiproliferative Agents with Distinct Effects on Cellular Signaling. *Journal of Medicinal Chemistry* 58:9591–9600.
- [279] Serebryanskaya, T. V., Lyakhov, A. S., Ivashkevich, L. S., Schur, J., Frias, C., Prokop, A., Ott, I. (2015) Gold(I) thiotetrazolates as thioredoxin reductase inhibitors and antiproliferative agents. *Dalton Transactions* 44:1161–1169.
- [280] Ray, S., Mohan, R., Singh, J. K., Samantaray, M. K., Shaikh, M. M., Panda, D., Ghosh, P. (2007) Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes. *Journal of the American Chemical Society* 129:15042–15053.
- [281] Deponte, M., Urig, S., Arscott, L. D., Fritz-Wolf, K., Réau, R., Herold-Mende, C., Koncarevic, S., Meyer, M., Davioud-Charvet, E., Ballou, D. P., Williams, C. H., Becker, K. (2005) Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase. *The Journal of Biological Chemistry* 280:20628–20637.
- [282] Ray, L., Katiyar, V., Barman, S., Raihan, M. J., Nanavati, H., Shaikh, M. M., Ghosh, P. (2007) Gold(I) N-heterocyclic carbene based initiators for bulk ring-opening polymerization of L-lactide. *Journal of Organometallic Chemistry* 692:4259–4269.
- [283] Wang, H. M. J., Lin, I. J. B. (1998) Facile Synthesis of Silver(I)–Carbene Complexes. Useful Carbene Transfer Agents. *Organometallics* 17:972–975.
- [284] Wang, H. M. J., Chen, C. Y. L., Lin, I. J. B. (1999) Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Gold(I)–Carbene Complexes. *Organometallics* 18:1216–1223.
- [285] Hesse, M., Meier, H., Zeeh, B. (2012) *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, 8. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart.
- [286] Chiba, K., Kawakami, K., Tohyama, K. (1998) Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro* 12:251–258.
- [287] Gillies, R. J., Didier, N., Denton, M. (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. *Analytical Biochemistry* 159:109–113.

- [288] Scragg, M. A., Ferreira, L. R. (1991) Evaluation of different staining procedures for the quantification of fibroblasts cultured in 96-well plates. *Analytical Biochemistry* 198:80–85.
- [289] Sridharan, G., Shankar, A. A. (2012) Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology* 16:251–255.
- [290] Laughton, C. (1984) Quantification of attached cells in microtiter plates based on Coomassie brilliant blue G-250 staining of total cellular protein. *Analytical Biochemistry* 140:417–423.
- [291] Kueng, W., Silber, E., Eppenberger, U. (1989) Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry* 182:16–19.
- [292] Hall, M. D., Telma, K. A., Chang, K.-E., Lee, T. D., Madigan, J. P., Lloyd, J. R., Goldlust, I. S., Hoeschele, J. D., Gottesman, M. M. (2014) Say no to DMSO: dimethylsulfoxide inactivates cisplatin, carboplatin, and other platinum complexes. *Cancer Research* 74:3913–3922.
- [293] Dulbecco, R., Freeman, G. (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8:396–397.
- [294] Gestraunthaler, G., Lindl, T. (2013) *Zell- und Gewebekultur. Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen*, 7. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- [295] Zheng, X., Baker, H., Hancock, W. S., Fawaz, F., McCaman, M., Pungor, E., JR (2006) Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology Progress* 22:1294–1300.
- [296] Even, M. S., Sandusky, C. B., Barnard, N. D. (2006) Serum-free hybridoma culture: ethical, scientific and safety considerations. *Trends in Biotechnology* 24:105–108.
- [297] van der Valk, J., Mellor, D., Brands, R., Fischer, R., Gruber, F., Gstraunthaler, G., Hellebrekers, L., Hyllner, J., Jonker, F. H., Prieto, P., Thalen, M., Baumans, V. (2004) The humane collection of fetal bovine serum and possibilities for serum-free cell and tissue culture. *Toxicology in Vitro* 18:1–12.
- [298] Gstraunthaler, G., Lindl, T., van der Valk, J. (2013) A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology* 65:791–793.
- [299] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews* 23:3–25.

- [300] Kessler, M., Ammer, H. (2013) Kleintieronkologie. Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen bei Hund und Katze, 3. Auflage, Enke Verlag, Stuttgart.
- [301] Werk, R. (1990) Medizinische Bakteriologie und Infektiologie. Basiswissen und Diagnostik. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- [302] Deutsches Institut für Normung e. V. (2009) Medical microbiology - Susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents - Determination of the minimum bactericidal concentration (MBC) with the method of microboudilondilution;. <https://www.beuth.de/de/norm/din-58940-7/117715941>. Zuletzt abgerufen am 15.11.2016.
- [303] Liu, W., Bendsdorf, K., Proetto, M., Hagenbach, A., Abram, U., Gust, R. (2012) Synthesis, characterization, and in vitro studies of bis(1,3-diethyl-4,5-diarylimidazol-2-ylidene)gold(I/III) complexes. *Journal of Medicinal Chemistry* 55:3713–3724.
- [304] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J. (2001) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1P11 of original article: S0169-409X(96)00423-1. *Advanced Drug Delivery Reviews* 46:3–26.
- [305] Lipinski, C. A. (2004) Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug discovery today. Technologies* 1:337–341.
- [306] Nikaido, H. (2003) Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:593–656.
- [307] Brown, D. G., May-Dracka, T. L., Gagnon, M. M., Tommasi, R. (2014) Trends and exceptions of physical properties on antibacterial activity for Gram-positive and Gram-negative pathogens. *Journal of medicinal chemistry* 57:10144–10161.
- [308] Ott, I., Scheffler, H., Gust, R. (2007) Development of a Method for the Quantification of the Molar Gold Concentration in Tumour Cells Exposed to Gold-Containing Drugs. *ChemMedChem* 2:702–707.
- [309] Ma, J., Stoter, G., Verweij, J., Schellens, J. H. (1996) Comparison of ethanol plasma-protein precipitation with plasma ultrafiltration and trichloroacetic acid protein precipitation for the measurement of unbound platinum concentrations. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 38:391–394.
- [310] Ott, I., Qian, X., Xu, Y., Vlecken, D. H. W., Marques, I. J., Kubutat, D., Will, J., Sheldrick, W. S., Jesse, P., Prokop, A., Bagowski, C. P. (2009) A Gold(I) Phosphine Complex Containing a Naphthalimide Ligand Functions as a TrxR Inhibiting Antiproliferative Agent and Angiogenesis Inhibitor. *Journal of Medicinal Chemistry* 52:763–770.

- [311] Holmgren, A., Lu, J., Vlamis-Gardikas, A., Zhao, R., Kandasamy, K., Engman, L., Engstrand, S., Hoffner, S. (2013) Bacterial thioredoxin reductase inhibitors and methods for use thereof. Patentschrift. Zuletzt abgerufen am 04.07.2016.
- [312] Bernhardt, G., Reile, H., Birnböck, H., Spruss, T., Schönenberger, H. (1992) Standardized kinetic microassay to quantify differential chemosensitivity on the basis of proliferative activity. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 118:35-43.

Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt vor allem Prof. Dr. Ingo Ott für die interessante Aufgabenstellung, die Freiheiten bei der Bearbeitung meines Projektes, die stetige konstruktive Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit meine eigenen Ideen einzubringen.

Des Weiteren möchte ich mich recht herzlich bei Herrn Prof. Dr. Hermann Wätzig aus dem Institut für Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig, als auch Prof. Dr. Ronald Gust aus dem Institut für Pharmazie und Pharmazeutische Chemie der Universität Innsbruck für die Übernahme meines Koreferats und Prof. Dr. Stephan Scherneck aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie der TU Braunschweig für die Übernahme des Vorsitzes meiner Prüfungskommission bedanken.

Ich bedanke mich sehr herzlich bei Bianka Karge, Dr. Raimo Franke und Dr. Mark Brönstrup aus dem Institut für Chemische Biologie des Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig für die umfangreiche Testung meiner Verbindungen im ESKAPE Panel und die sehr angenehme und fruchtbare Kooperation.

Meinen Kooperationspartnern Dr. Rainer Misgeld und Dr. Dr. Aram Prokop aus der Abteilung der Experimentellen Onkologie des Kinderkrankenhauses in Köln möchte ich vor allem für die Durchführung der Zellzyklus-Analyse an meinen Verbindungen danken.

Für die tatkräftige Unterstützung bei den Enzyminhibitionstests danke ich meiner HIWI/Ine Jana Rühmkorf.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die angenehme Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Insbesondere Dr. Lutz Preu, Dr. Hans-Otto Burmeister, Dr. Johann Grünefeld, Britta

Thomas, Eduard Hinz, Frank Roesse, Thomas Hoffmann, Matthias Söchtig, Klaus Hartmann und Kerstin Stats sei hiermit herzlich gedankt.

Vor allem danke ich den derzeitigen Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe Hilke Burmeister, Dr. Annika Groß, Agnieszka Prochnicka, Wojciech Streciwilk und Jessica Wölker für die schöne und in vielerlei Hinsicht inspirierende Zeit, in der ihr bei der Arbeit immer wieder mit einer motivierenden Portion Spaß und Schabernack für gute Laune gesorgt habt. Petra Lippmann danke ich besonders für die vielseitige Unterstützung im Zellkulturlabor und ihre ansteckende Fröhlichkeit. Ich möchte mich weiterhin bei den ehemaligen „Ottern“ Andreas Meyer und Dr. Luciano Oehninger für die ersten Einblicke in die Welt der Organometallkomplexe während meines Pharmaziestudiums bedanken.

Ich danke sehr herzlich Dr. Annika Groß und Jessica Wölker für das passionierte Korrekturlesen dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie und insbesondere Hesm für die stetige Motivation und Unterstützung in den letzten Jahren.

CURRICULUM VITAE

NAME	Claudia Schmidt
GEBOREN AM	19. Februar 1985
GEBURTSORT	Celle
NATIONALITÄT	deutsch
 [03/2013 – 04/2017]	Promotion (Dr. rer. nat.) Technische Universität Braunschweig Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie Arbeitskreis Prof. Dr. Ingo Ott
[03/2013 – 02/2016]	Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik Apothekerkammer Niedersachsen, Hannover
[01/2013 – 01/2013]	Stellvertretende Filialleiterin Antares Apotheke, Celle
[12/2012]	Approbation als Apothekerin Apothekerkammer Niedersachsen, Hannover
[05/2012 – 10/2012]	Pharmazeutin im Praktikum – zweiter Abschnitt Antares Apotheke, Celle
[11/2011 – 04/2012]	Pharmazeutin im Praktikum – erster Abschnitt Technische Universität Braunschweig Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie Arbeitskreis Prof. Dr. Ingo Ott
[10/2006 – 10/2011]	Pharmaziestudium Technische Universität Braunschweig
[03/2006]	Rettungssanitäterin nach §§5 ff. APOV-RettSan Malteser Schulungszentrum Nellinghof, Neuenkirchen
[10/2005 – 09/2006]	Freiwilliges Soziales Jahr Malteser Hilfsdienst gGmbH, Celle
[08/1997 – 06/2005]	Abitur Kaiserin-Auguste-Viktoria-Gymnasium, Celle

WISSENSCHFTLICHE PUBLIKATIONEN

Schmidt, C., Karge, B., Misgeld, R., Prokop, A., Franke, R., Brönstrup, M., Ott, I. Gold(I) NHC Complexes: Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-positive directed Antibacterial Effects. *Chem. Eur. J.* (2017) 23(8), 1869 – 1880, DOI: 10.1002/chem.201604512.

Appold, M., Mari, C., Lederle, C., Elbert, J., **Schmidt, C.**, Ott, I., Stühn, B., Gasser, G., Gallei, M. Multi-Stimuli Responsive Block Copolymers as Smart Release Platform for a Polypyridyl Ruthenium Complex. *Polym. Chem.* (2017) 8, 890-900, DOI: 10.1039/C6PY02026G.

Walther, W., Dada, O., O'Beirne, C., **Schmidt, C.**, Ott, I., Sanchez-Sanz, G., Werner, C., Zhu, X., Tacke, M. In Vitro and In Vivo Investigations into the Carbene Gold Chloride and Thioglucoside Anticancer Drug Candidates NHC-AuCl and NHC-AuSR. *Lett. Drug. Des. Discov.* (2017) 14(2), 125-134, DOI: 10.2174/1570180813666160826100158.

Skiba, J., **Schmidt, C.**, Lippmann, P., Ensslen, P., Wagenknecht, H.-A., Czerwieniec, R., Bandl, F., Ott, I., Bernaś, T., Krawczyk, B., Szczukocki, D., Kowalski, K. Substitution of metallocene with [2.2]-paracyclophane to enable confocal microscopy imaging in living cells. *Eur. J. Inorg. Chem.* (2017) (2), 297–305, DOI: 10.1002/ejic.201600281.

Oehninger, L., Küster, L. N., **Schmidt, C.**, Munoz-Castro, A., Prokop, A., Ott, I. A Chemical-Biological Evaluation of Rhodium(I) *N*-Heterocyclic Carbene Complexes as Prospective Anticancer Drugs. *Chem. Eur. J.* (2013) 19, 17871–17880, DOI: 10.1002/chem.201302819.

Simpson, P. V., **Schmidt, C.**, Ott, I., Bruhn, H., Schatzschneider, U. Synthesis, Cellular Uptake and Biological Activity Against Pathogenic Microorganisms and Cancer Cells of Rhodium and Iridium *N*-Heterocyclic Carbene Complexes Bearing Charged Substituents. *Eur. J. Inorg. Chem.* (2013) 32, 5547–5554, DOI: 10.1002/ejic.201300820.

WISSENSCHAFTLICHE TAGUNGSBEITRÄGE

Schmidt, C., Ott, I. Fluorinated Gold(I) *N*-Heterocyclic Carbene Complexes As Anticancer Agents: Cytotoxicity, Thioredoxin Reductase Inhibition, Cellular Uptake Studies, Protein Binding And Stability (Poster), 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC), Budapest (2016).

Schmidt, C., Neue halogenierte *N*-heterozyklische Carben Gold(I) Komplexe mit antiproliferativen Eigenschaften als potentielle Zytostatika (Vortrag), Pharmazieseminar SS2016, Braunschweig (2016).

Schmidt, C., Reichl, S., Ott, I. Fluorinated Gold(I) *N*-heterocyclic Carbene Complexes with Anticancer Properties – Investigation of Cytotoxicity, Enzyme Inhibition, Biodistribution and Intestine Permeability (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Düsseldorf (2015).

Schmidt, C., Misgeld, R., Prokop, A., and Ott, I. Halogenated Gold(I) *N*-heterocyclic Carbene Complexes – Biodistribution, Cytotoxicity and Thioredoxin Reductase Inhibition (Poster), 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC), Galway (2015).

Schmidt, C., Sergeev, G., Franke, R., Brönstrup, M., Ott, I. Halogenated Gold(I) NHC Complexes and their Antiproliferative Effects on Tumor Cells and Bacteria (Poster), Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), Frankfurt (2014).

Schmidt, C., Ott, I. Halogenated Gold(I) NHC Complexes and their Biological Evaluation (Poster), 12th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC), Zürich (2014).

Schmidt, C. Total X-Ray Fluorescence (TXRF) Spectroscopy: A New Method for the Determination of Metal Traces in Pharmaceuticals (Vortrag) DFG Forschergruppe 630 Young Investigators Symposium, Fulpmes (2013).